

**Pathogenese und Ansätze zur Kontrolle von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* –
Erreger des Eschentriebsterbens: Variabilität von Virulenz, Morphologie,
Biochemie und Sekundärstoffwechsel**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Corina Junker
aus Dessau

1. Referentin:

Privatdozentin Dr. Barbara Schulz

2. Referent:

Professor Dr. André Fleißner

3. Referent:

Professor Dr. Michael Steinert

eingereicht am: 15.05.2013

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.07.2013

Druckjahr 2013

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Junker, C., Mandey, F., Pais, A., Ebel, R., Schulz, B. (2013): *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and *Hymenoscyphus albidus*: viridiol concentration and virulence do not correlate. Forest Pathology: doi 10.1111/efp.12066.

Tagungsbeiträge

Junker, C.; Schulz, B.: Multiple faces of *Chalara fraxinea*. (Poster) IMC 9 The Biology of Fungi, Edinburgh, UK, (2010).

Junker, C.; Schulz, B.: Bisherige Untersuchungen zur Pathogenese des Gefäßpilzes *Chalara fraxinea*. (Vortrag) Treffen AG Eschentriebsterben, Eberswalde (2010).

Junker, C.; Schulz, B.; Citron, C.; Dickschat, J.: A closer look at culture extracts of *Chalara fraxinea*. (Poster) Mibi-Retreat, Burg Warberg, Deutschland (2012).

Junker, C.; de Vries, J.; Messal, M.; Citron, C.; Dickschat, J.; Schulz, B.: Can endophytic fungi be used to control ash dieback? (Poster) COST Action FA1103: Endophytes in biotechnology and agriculture, Reims, Frankreich (2012).

Junker, C.; Citron, C.; Dickschat, J.; Andrée, N.; Eickhorst, C.; Schulz, B.: Do secondary metabolites of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* correlate with its virulence? (Poster und Vortrag) BMS Meeting – Fungal Interactions, Alicante, Spanien (2012).

Junker, C.; Rommel, S.; de Vries, J.; Andrée, N.; Eickhorst, C.; Schulz, B.: Endophytische Pilze als Antagonisten von *Chalara fraxinea*? (Poster) 58. Deutsche Pflanzenschutztagung, Braunschweig, Deutschland (2012).

Metzler, B.; Junker, C.; Lenz, H.; Enderle, R.; Schulz, B.: Ash dieback: situation and research in Germany. (Vortrag) COST Action FP1103 FRAXBACK 1st MC/WG Meeting, Vilnius, Litauen (2012).

Junker, C.; Schulz, B.: Charakterisierung und Bekämpfung von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. (Vortrag) Treffen AG Eschentriebsterben, Gotha (2012).

Junker, C.; Schulz, B.: *H. albidus* and *H. pseudoalbidus*: viridiol concentration and virulence do not correlate. (Vortrag) COST Action FP1103 2nd FRAXBACK Management Committee Meeting, Braunschweig, Deutschland (2013).

Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an **Frau PD Dr. Barbara Schulz**, für die schöne Zusammenarbeit und die exzellente, fachliche Betreuung als Mentorin, aber auch für die Unterstützung in den vielen Jahren meiner Tätigkeit im Labor und final während meiner Promotion.

Prof. Dr. Michael Steinert möchte ich danken, dafür dass er mir ermöglicht hat, die Labore für meine Arbeiten zu nutzen und für die Bereitschaft zur Übernahme des Prüfungsvorsitz.

Prof. Dr. André Fleißner danke ich sehr für die Übernahme des zweiten Referates. Ein großer Dank gilt der **Deutschen Bundesstiftung Umwelt** und meiner Betreuerin **Frau Dr. Schlegel-Starmann** für das in mich gesetzte Vertrauen zum Erhalt eines Stipendiums für drei Jahre und damit die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Dissertation.

Ein nicht unerheblicher Dank geht auch an die Kooperationspartner **Dr. Jeroen Dickschat** und **Christian Citron** vom Institut für organische Chemie der TU Braunschweig für die Aufklärung möglicher Virulenzfaktoren und deren Strukturen; an **Dr. Rainer Ebel** und seinen Mitarbeitern von der School of Natural and Computing Sciences der Universität Aberdeen für die Viridiolmessungen; an **Dr. Thomas Kirisits** vom BOKU in Wien und **Prof. Dr. Ottmar Holdenrieder** von der ETH in Zürich für die Überlassung von *H. albidus* Stämmen und an **Dr. Jörg Schumacher** für den regen Gedankenaustausch zu meiner Arbeit.

Den Studenten **Susann, Sophie, Jan, Mandy, Nicole** und **Chris** möchte ich dafür danken, dass sie ihre Bachelorarbeit bei uns angefertigt haben und mich um diese Erfahrung aber auch unser Forschungsprojekt um neue Erkenntnisse bereichert haben.

Allen Beteiligten des **Arbeitskreises Eschentriebsterben** unter der Leitung von **Dr. Paul Heydeck** danke ich für Diskussionen und Anregungen zu meiner Arbeit.

Der **COST Action FP1103** möchte ich für die Möglichkeit zur Teilnahme an den Expertentagungen und sowie der Kostenübernahme danken.

Vielen Dank an die gesamte AG Steinert : **Elena, Gabi, Julia, Janine, Jens, Qunxiu, Olga, Simone**, sowie den ehemaligen Mitarbeitern **Kathrin, Siegfried, Christopher, Frederike** und **Jana**. Die tolle Arbeitsatmosphäre und die ständige Bereitschaft zur gegenseitigen Hilfe, aber auch die gemeinsamen Unternehmungen werden mir immer in besonderer Erinnerung bleiben.

Ein dickes Dankeschön gilt meiner **Mutti** für den bedingungslosen Rückhalt und die Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Meiner guten Freundin **Sinja** danke ich für die Hilfe beim Design und Erstellen des Buchrückens meiner Dissertationsarbeit aber auch für die tolle Freundschaft. Ein Dank geht auch an den gesamten **Freundeskreis**, denn ohne sie wäre alles nur halb so schön.

Dem gesamten Institut für **Mikrobiologie** sage ich danke für die angenehme Atmosphäre und gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	9
2.1 Anlass der Promotion	9
2.2 <i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	14
2.3 Die Esche.....	16
2.4 Pilz-Wirt Interaktion	19
2.5 Endophyten	21
2.6 Ziele der Promotion	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Nährmedien, Lösungen und Puffer.....	24
3.2 Pilzstämme	30
3.3. Verwendetes Saatgut.....	42
3.4 Isolierung von <i>H. pseudoalbidus</i> und Pilzendophyten.....	42
3.5 Stammhaltung	43
3.6 Morphologieuntersuchungen.....	43
3.6.1 Makroskopische Auswertung.....	43
3.6.2 Mikroskopische Auswertung.....	44
3.6.3 Vegetative Kompatibilität.....	44
3.7 Isolierung pilzlicher DNS	45
3.8 PCR und Sequenzierung	45
3.9 Exoenzymproduktion.....	46
3.9.1 Cellulase	47
3.9.2 β -Glucosidase	47
3.9.3 Laccase und Peroxidase	47
3.9.4 Polyphenoloxidase	48
3.9.5 Tyrosinase	48
3.9.6 Amylase	49
3.9.7 Lipase	49
3.10 Kulturextraktherstellung.....	49
3.10.1 Pilz-Flüssigkultur	49
3.10.2 Extraktion von Pilzkulturen auf Fest-Medium	50
3.11 Dünnschichtchromatographie	51
3.11.1 Auswertung der Substanzen mit UV-Licht-Detektion	52
3.11.2 Auswertung der Substanzen durch Verkohlung.....	52

3.12 Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	53
3.13 CLSA-Analyse flüchtiger Substanzen	54
3.14 Eschenschnellanzucht.....	54
3.15 <i>In Vitro</i> Virulenz-Tests	55
3.15.1 Agardiffusionsassay mit <i>Chlorella fusca</i>	55
3.15.2 Keimungstest mit <i>Agrostis stolonifera</i>	56
3.15.3 Blattsegmenttest von <i>Fraxinus excelsior</i>	56
3.15.4 Auskeimtest mit Pilzkulturextrakten	57
3.15.5 Infektion axenischer Eschensämlinge.....	57
3.15.6 Alternative Infektion mit Basilikumsämlingen	58
3.15.6.1 Anzucht Basilikumsämlinge.....	58
3.15.6.2 Auskeimtest Basilikumsämlinge.....	58
3.15.6.3 Infektion Basilikumsämlinge	59
3.16 Infektion junger Eschen im Gewächshaus	59
3.17 Bonitur der Infektionsversuche	60
3.18 Mikroskopie	60
3.18.1 Lichtmikroskopie	60
3.18.2 Rasterelektronenmikroskopie	61
3.19 Dualkulturen von Endophyten und <i>H. pseudoalbidus</i>	62
3.20 Hemmtest gegen Fruchtkörper von <i>H. pseudoalbidus</i>	63
4. Ergebnisse.....	65
4.1 Pilz-Isolate aus der Esche	65
4.2 Morphologische Charakteristika der <i>H. pseudoalbidus</i> - Isolate.....	65
4.2.1 Morphologie und Histologie des Apotheziums.....	65
4.2.2 Mikroskopische Merkmale des Anamorph	71
4.2.3 Kultureigenschaften des Anamorph.....	72
4.2.4 Vegetative Kompatibilität.....	76
4.3 ITS-Sequenzierungen.....	77
4.4 Exoenzymproduktion.....	78
4.5 Dünnschichtchromatographie der Pilzkulturextrakte.....	79
4.6 Nachweis von Viridiol mittels GC-MS	81
4.7 Vorzeitige Dormanzbrechung von <i>Fraxinus excelsior</i>	83
4.8 <i>In vitro</i> Virulenz- Untersuchungen	84
4.8.1 Flüchtige Substanzen aus <i>H. pseudoalbidus</i>	84
4.8.2 Virulenztests mit Pilzkulturextrakten.....	86
4.8.2.1 Agardiffusionsassay mit <i>Chlorella fusca</i>	86

4.8.2.2 Keimungstest mit <i>Agrostis stolonifera</i>	88
4.8.2.3 Blattsegmenttest	89
4.8.2.4 Auskeimtest Eschensamen	91
4.8.2.5 Auskeimtest Basilikumsamen	93
4.8.3 Infektionen von Eschensämlingen.....	93
4.8.4 Histologie axenisch infizierter Eschensämlinge	96
4.9 Infektionen von Basilikumsämlingen	98
4.10 <i>In vivo</i> Infektion von Eschen	100
4.11 Pilzendophyten aus der Esche.....	101
4.11.1 Dualkulturversuche Endophyt - <i>H. pseudoalbidus</i>	101
4.11.2 Dünnschichtchromatographie der Dualkulturen.....	104
4.11.3 Viridiolgehalt Monokultur gegenüber Dualkultur.....	106
4.11.4. Inokulation von Endophyten in Eschensämlinge	107
4.12 Hemmung der Fruchtkörperentwicklung von <i>H. pseudoalbidus</i>	110
5. Diskussion.....	114
5.1 Morphologische Charakteristika	115
5.1.1 Teleomorph	115
5.1.2 Anamorph	118
5.2 Kultivierung.....	119
5.3 Genetik.....	120
5.4 Vegetative Kompatibilität	121
5.5 Virulenzfaktoren: Exoenzymaktivität und toxische Sekundärmetabolite.....	122
5.6 Variabilität der Virulenz	129
5.7 Hemmung von <i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	133
6. Ausblick.....	140
8. Literaturverzeichnis	141
9. Anhang	154

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BM	Biomalz-Medium
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca(ClO ₂) ₂	Calciumhypochlorit
<i>C. f.</i>	<i>Chalara fraxinea</i>
cm	Zentimeter
d	Durchmesser
DC	Dünnschichtchromatographie
EtAc	Ethylacetat
et al.	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
<i>F. e.</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>
FG	Frischgewicht
g	Gramm
gleichm.	gleichmäßig
h	Stunde
HDMS	Hexamethyldisilazan
<i>H. a.</i>	<i>Hymenoscyphus albidus</i>
<i>H. p.</i>	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
JKI	Julius-Kühn-Institut
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KM	Kartoffel-Möhre-Medium

MeOH	Methanol
mg/L	Milligramm pro Liter
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MS	Zellkulturmedium nach Murashige und Skoog
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PH	partielle Hemmung
R	Radius
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Rm	mittlerer Radius
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT [°C]	Raumtemperatur
sec	Sekunden
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
ungl.	ungleichmäßig
z.B.	zum Beispiel
µL	Mikroliter
Zeichen:	
β	Beta
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden 175 Isolate des Anamorphs von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, vormals als *Chalara fraxinea* bezeichnet, charakterisiert. Die Untersuchungen dienten der Aufklärung der Pathogenese des Eschentriebsterbens, das primär durch die erst 2006 identifizierte Spezies, ausgelöst wurde. Dabei wurden die Variabilität des Phänotyps, der Biochemie, der Sekundärmetabolite und im Besonderen der Virulenz untersucht. Die Merkmale wurden auf Korrelationen untereinander, aber vor allem zwischen phänotypischen, biochemischen Eigenschaften und der Konzentration des Phytotoxin Viridiol in Kulturextrakten mit der Virulenz überprüft. Versuche mit Endophyten aus der Esche in Dualkultur, in Infektionsstudien mit Eschensämlingen und als Kulturextrakte gegen *H. p.* lieferten einen möglichen Ansatz zur biologischen Kontrolle des Pathogens, sowie auch der Einsatz zweier Fungizide und eines Düngemittels.

Die Versuche führten zu folgenden Ergebnissen:

- Farbgebung und Beschaffenheit des Luftmyzels der Isolate variierten stark. Alle wiesen Tönungen von Gelb, Braun, Weiß und Grau auf und bildeten ein kompaktes, luftiges, dünnes, oder eine Kombination aus diesen Eigenschaften bestehendes Myzel. Das Temperaturoptimum der Isolate lag bei ca. 20 - 25 °C. Die Wachstumsgeschwindigkeit variierte von Isolat zu Isolat.
- Jedes Isolat hatte ein fast individuelles Exoenzymprofil. Die am häufigsten produzierten Enzyme waren Tyrosinase (97%), Lipase (95%), β -Glucosidase (87%) und Laccase (74%).
- Die Sekundärmetabolitenprofile der Kulturextrakte, die via Dünnschichtchromatographie untersucht wurden, wiesen eine Vielzahl verschiedener Banden auf und waren individuell für jedes Isolat.
- Das Phytotoxin Viridiol war nicht in allen Kulturextrakten der *H. p.* - Isolate nachweisbar. Die höchste Konzentration wurde in einem Extrakt eines Isolates von *H. albidus* nachgewiesen.
- Im Blattsegmenttest und Samenauskeimtest von *F. e.* mit Kulturextrakten von *H. p.* - Isolat, wurde die Variabilität der Virulenz der Isolate gezeigt. Durch Applikation der Extrakte auf Eschenblättern kam es zu unterschiedlich starker Nekrosenbildung. Im Auskeimtest mit Samen der Esche hatte der Extrakt im Medium eine zum Teil stark hemmende Wirkung und unterdrückte die Bildung von Kotyledonen und Sprossen. Die Tests korrelierten untereinander mit einem Wert von $P = -0,89$.
- Hemmhoftests mit *Chlorella fusca* und Auskeimungstests mit Samen von *Agrostis stolonifera* und *Ocimum basilicum* dienten ebenfalls der Überprüfung der Toxizität der Kulturextrakte. Die Wirksamkeit der Extrakte differierte, die Ergebnisse korrelierten aber nicht mit den Tests gegen den Wirt.
- Infektionsversuche an axenisch kultivierten Eschensämlingen mit verschiedenen Isolaten von *H. p.* bestätigten die Unterschiede in der Virulenz der Stämme. Die Virulenz der einzelnen Isolate korrelierte nicht mit der Viridiolkonzentration der Isolate gemessen in den Kulturextrakten ($P = -0,22$).
- Infektionen von axenisch kultivierten Eschensämlingen mit dem Endophyt 9938 indizieren dessen mutualistischen Einfluss auf die Pflanzen, da das Wachstum des Wirts signifikant gefördert wurde. In Kombination mit dem Pathogen jedoch gab es keine Milderung der Symptomatik, die durch die Infektion mit *H. p.* verursacht wurde.
- Infektionstest mit axenisch kultivierten Basilikumsämlingen erwiesen sich als einen guten Schnelltest, um ein erstes Indiz für die unterschiedliche Pathogenität der *H. p.* - Isolate zu erhalten. Die Ergebnisse der Infektionsstudien an Basilikumsämlingen korrelierten mit einem Wert von $P = 0,81$ mit denen an Eschensämlingen.
- In Dualkulturversuchen mit Endophyten aus gesundem Eschenmaterial haben alle Endophyten das Wachstum der *H. p.* - Isolate gehemmt. Das größte Potenzial hatte *Phomopsis* 9938, mit einer Hemmung von durchschnittlich 40%.
- In Dualkulturen von Isolaten von *H. p.*, kultiviert mit den Endophyten 9938, 9939 und 9942, war die Produktion des Phytotoxin Viridiol deutlich niedriger.
- Applikationen der Kulturextrakte der Endophyten, der Fungizide Mirage® und Prosper® und des Düngemittels Kalkstickstoff hemmten die Fruktifikation der Apothezien von *H. p.*, die für die Verbreitung der Krankheit verantwortlich gemacht werden, zu 80 bis 100%.

2. Einleitung

2.1 Anlass der Promotion

Aus stetigem und immer noch hoch aktuellem Anlass gilt es, das im Jahr 1990 entdeckte Triebsterben an Eschen in Europa mit Nachdruck weiter zu erforschen. *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, Verursacher dieser chronisch bis letal verlaufenden Erkrankung, wird mittlerweile primär für das Eschentriebsterben verantwortlich gemacht (EPPO = European and Mediterranean Plant Protection Organization). Im Jahre 2007 wurde dieser Ascomycet auch in Deutschland nachgewiesen (Schumacher et al., 2007). In den letzten Jahren wurde intensiv in mehreren europäischen Ländern geforscht, um den Erreger gründlich zu analysieren und zu charakterisieren. Seit nunmehr 21 Jahren wird in Polen ein intensives Eschentriebsterben beobachtet (Kowalski, 2006), welches von dort ausgehend über die baltischen Staaten (Lygis et al., 2005), Südschweden (Barklund, 2005; PATHCAR, 2007; Thomsen et al., 2007; Bakys et al., 2009), Dänemark (Thomsen et al., 2007), Deutschland (Schumacher et al., 2007), Frankreich (EPPO), Belgien (Chandelier et al., 2011), Österreich (Cech, 2006; Halmschlager und Kirisits, 2008), Tschechische Republik (Jankovsky et al., 2008), Schweiz (Queloz et al., 2011) und seit ein paar Jahren nun auch südlich der Alpen in der Slowakei (Kunca, 2006), Ungarn (Szabó, 2009), Slowenien (Orgis et al., 2009) und Italien (Orgis et al., 2010) zu beobachten ist (Abb. 2.1). Damit hat der Erreger nicht nur den Sprung über die Alpen geschafft, sondern ist auch in wärmere Gebiete vorgedrungen. Die letzten positiven Fundmeldungen kamen im Februar 2012 aus Großbritannien (Webber und Hendry, 2012) und im Oktober des gleichen Jahres sogar aus Irland (Douglas und

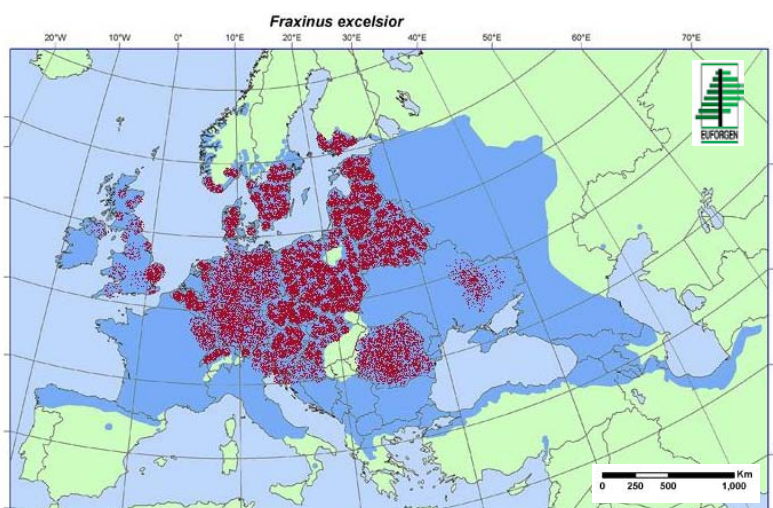


Abbildung 2.1: Natürliche Verbreitung der Gemeinen Esche nach EUFORGEN (blau schattiert) und Auftreten des Eschentriebsterben (rot schattiert). Modifiziert nach Pautasso et al., 2013.

Ryan, 2012). Hierbei handelte es sich um Baumschulware, importiert beispielsweise aus den Niederlanden. Die Meldungen und Berichte von Forstwirten und forstwissenschaftlichen Forschungseinrichtungen mit immer der gleichen Beschreibung der Symptomatik (EPPO) gehen indes weiter. Junge Bäume weisen nekrotisierte Bereiche (Abb. 2.2) an der Rinde auf und zeigen bald infolge einer Unterversorgung mit Wasser und Nährstoffen welke Triebe (Abb. 2.3) und vorzeitigen Blattverlust.



Abbildung 2.2: Junger Stamm von *F. excelsior* mit einer großflächigen Nekrose. Standort: Buckow (Deutschland). Foto: Dr. Paul Heydeck, Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde.



Abbildung 2.3: Junge Esche (*F. excelsior*) mit einer ausgeprägten Triebsterben oben. Standort: Clingen (Deutschland). Foto: Dr. Paul Heydeck, Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde.

Alte Bäume (Abb. 2.4) hingegen haben aufgrund der Verholzung des Stammes keine derartigen krankhaften Veränderungen an der Rinde, deshalb breitet sich hier der Pilz in den jüngeren Trieben des Baumes aus. Das Schadbild an älteren Bäumen äußert sich anfangs in schütterer Belaubung und Triebsterben in der Kronenperipherie (Abb. 2.5) und verstärkt sich durch erhöhte Auflichtung der gesamten Krone mit vielen toten vertrockneten Zweigen. Hinzu kommt ein Befall von sekundären Schadorganismen, wie rindenbrütender Käfer und holzabbauender Schwächeparasiten, wie den Hallimasch (7. Waldschutz-Info 2009, Metzler, 2012).



Abbildung 2.4: Esche (*F. excelsior*) ohne Symptome, Standort Mittelriede, Braunschweig. Foto C. Junker



Abbildung 2.5: Esche (*F. excelsior*) mit stark reduzierter Krone und Triebsterben, Standorte: Bollersdorfer Höhe (Märkische Schweiz, Deutschland) und Pyhrnpass (Österreich). Fotos Dr. Paul Heydeck, Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde.

Auch die EPPO stuft diesen Pilzpathogen als äußerst gefährlich ein und setzte ihn 2007 auf die Warnliste für pilzliche Pflanzenschädlinge. Er gehört zu einer Gruppe von Pilzen, die das Splintholz zerstören und die Leitungsbahnen schädigen (Cech & Hoyer-Tomiczek, 2007, Sobczyk, 2009), daher ist er von großer ökologischer Bedeutung. Die anamorphe Form (früher als *Chalara fraxinea* bezeichnet) scheint epidemiologisch keine Bedeutung zu haben, da er sich nicht über dessen Konidien zu verbreiten scheint (Kirisits & Cech, 2009). Sie dienen vermutlich als Spermatien zur Karyogamie mit den Hyphen der Hauptfruchtform, aus denen sich dann die Fruchtkörper von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* entwickeln (Gross et al., 2012b, Kirisits et al., 2013). *H. pseudoalbidus* (zunächst als *H. albidus* identifiziert) wurde im Zusammenhang mit erkrankten Eschen in Polen 2008 auf verrottenden Blattstielen der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) gefunden. *H. albidus*, bereits seit 1851 als harmloser Streulaubzersetter bekannt, sollte sich nun zu einem aggressiven Pathogen entwickelt haben. Beobachtungen der schweizer Forscher Queloz et al. (2011) zeigten, dass es ein massenhaftes Auftreten weißlicher Fruchtkörper nördlich der Alpen in einem Gebiet mit starkem Triebsterben an Eschen gab, aber südlich der Alpen, wo die Eschen noch gesund sind, ebenfalls Fruchtkörper vorkamen. Allerdings fand man hier Fruchtkörper in 20 fach geringerem Ausmaß vor. Infolge genetischer Untersuchungen zeigte sich, dass es sich bei den massenhaft aufgetretenen Fruchtkörpern um eine andere Art handelt. Nach aktuellen genetischen Studien gilt der zwischenzeitlich als Teleomorph zugeordnete *H. albidus* nicht mehr als Hauptfruchtform von *C. fraxinea*. Die Untersuchungen zeigten, dass sich die beiden Formen in nur 4 Markern unterscheiden (Kirisits, 2010). Aufgrund der Ähnlichkeiten wurde die neu entdeckte Form als *Hymenoscyphus pseudoalbidus* bezeichnet, dem "Falschen Weißen Stengelbecherchen" (Queloz et al., 2011). Angesichts der Härte, mit der der Pilz europäische Eschen befällt und der Verbreitungsrichtung von Nordost nach Süden und Südost, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Pathogen um eine invasive Spezies handelt, welche sich mit der Zeit über ein neues geografisches Gebiet ausbreitete (Bakys et al., 2009, Timmermann et al., 2011). Zumal die Eschenart *Fraxinus ornus* (Blumenesche), eine mit asiatischen Arten nah verwandte Esche, weniger anfällig für den Pathogen ist (Zhao et al., 2012). Abbildung 2.6 veranschaulicht die Abfolge, mit der Eschen durch die Ascosporen von *H. pseudoalbidus* infiziert werden.

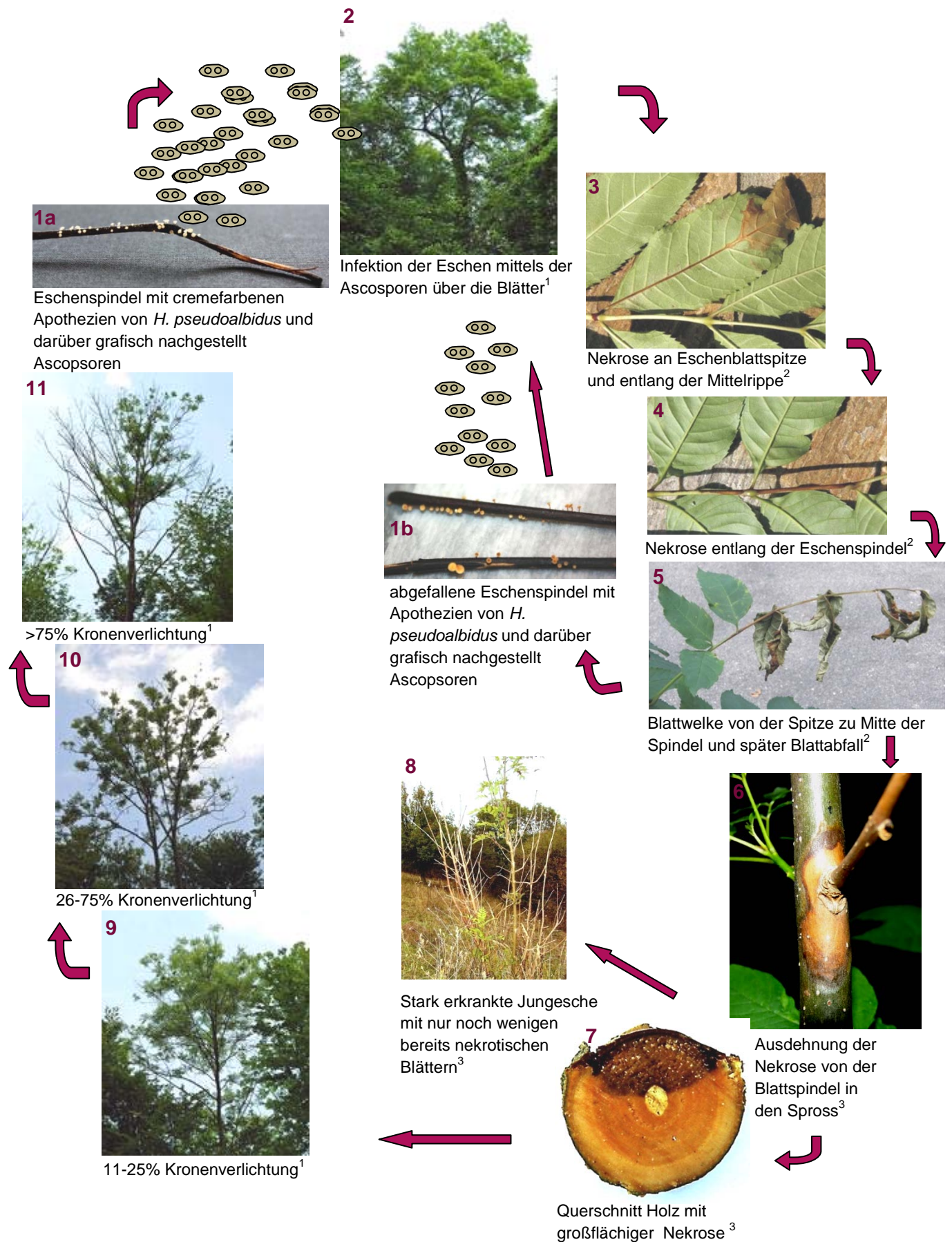


Abbildung 2.6: Abfolge der Escheninfektion durch Ascosporen von *H. pseudoalbidus*. Beginn der Infektion ist an den Blättern. ¹ Fotos (G. Witzel) und Stadien der Kronenverlichtung infolge des Eschentriebsterben, Metzler, 2012; ² Fotos aus Krätler und Kirisits, 2012, ³ Aufnahmen zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Heydeck, Landeskompetenzzentrum Forst Eberswalde).

Zu Beginn bilden sich auf denen im Streu liegenden Blattspindeln die Apothezien (1a), welche die Ascosporen frei setzen. Diese infizieren die Blätter am Baum (2, 3) und das sich dort bildende Myzel wächst von der Blattspindel (4) in die Zweige (5, 6) und breitet sich von hier weiter im Holz (6, 7) aus (Kowalski und Holdenrieder, 2008, Bakys et al., 2009, Kräutler und Kirisits, 2012). In den folgenden Jahren kommt es vor allem bei Jungpflanzen meist zu einem baldigen Sterben des Baumes (8) oder zu einer stärker werdenden Verlichtung der Krone und zur büschelartigen Ausbildung von Ersatztrieben im unteren Stammbereich, zu beobachten bei älteren Bäumen (9-11) (Metzler, 2012). Auf den abgefallenen Blattspindeln (1b) bilden sich im darauf folgenden Jahr erneut Apothezien aus und der Infektionskreislauf beginnt von vorn.

Eine mögliche und bislang unterschätzte Gefahr ist neben dem Import von Baumschulware, der Handel mit Baumstämmen aus betroffenen Gebieten. Der Nachweis von Phialiden und Konidien des Anamorph von *H. p.* an Baumstämmen (Husson et al., 2011), aber auch die Fähigkeit auf Totholzstellen von Sämlingen Apothezien zu bilden (Kirisits et al., 2012) zeigt, wie vorsichtig mit Eschenware umgegangen werden muss. Eine nicht sichtbare Symptomatik spricht die Pflanzen nicht von einem Befall mit dem Erreger frei. In gleichem Maße Vorsicht ist mit dem Handel von Samen geboten. Der Import von Eschensamen ist in der Vergangenheit stark angestiegen und somit auch der des Pathogens. Untersuchungen von Samen erkrankter Eschen erbrachten den Beweis, dass die anamorphe Form auch in den Samen vorkommen kann. Welchen Effekt dies auf die Samenkeimung hat oder inwieweit dies zur Verbreitungsstrategie des Erregers gehört ist nicht bekannt (Cleary et al., 2012).

Aufgrund des immer noch hohen Infektions- und Ausfallrisikos, nicht zuletzt aufgrund der extrem flugfähigen Ascosporen von *H. p.*, ist es nach jetzigem Wissenstand nicht sinnvoll neue Eschen zu pflanzen (Metzler, 2009). Das weitere Ausmaß der Krankheit ist noch nicht absehbar und der Ursprung von *H. p.* noch nicht geklärt. Deshalb gibt es bislang, bedingt durch die unterschiedlich zuständigen Behörden, verschiedene Handlungsempfehlungen (u.a. diverse Forstschutzämter der Bundesländer, Kirisits et al, 2012). Dabei ist besonders die Eschenart *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche) betroffen. Die Erkrankung der Gemeinen Esche, welche sich in kürzester Zeit zu einer Pandemie entwickelt hat, erfordert weiterhin eine hohe

Aufmerksamkeit. Anlass zur Hoffnung geben Berichte über resistente Klone aus Dänemark, die in Inokulationsversuchen mit *H. p.* vorzeitige Blattsensenz zeigten und damit eine Verbreitung des Pathogens und der Erkrankung verhindern (McKinney et al., 2012a). Inokulationsversuche unter natürlichem Befallsdruck an verschiedenen Sorten von *F. e.* in Ellerhoop in Schleswig-Holstein zeigten erhebliche Unterschiede in der Anfälligkeit der einzelnen Sorten. Dabei waren die Sorten „Geesink“ und „Altena“ am widerstandsfähigsten. Dagegen hatte die Herkunft der Pflanzen keinen Einfluss auf die Befallsstärke. Im Weiteren sei eine präventive Behandlung mit Kontaktfungiziden in Baumschulen möglich (Lösing, 2012), ein Einsatz der auch in dieser Arbeit behandelt wird.

2.2 *Hymenoscyphus pseudoalbidus*

Hymenoscyphus pseudoalbidus, zu Deutsch Falsches Weißes Stengelbecherchen, gehört zu den Schlauchpilzen (Ascomycota). Er ist seit seiner genetischen Einordnung als Schwesterart des saprophytisch lebenden Falllaubzersetzers und nicht virulenten *Hymenoscyphus albidus* bekannt. Die Einordnung in die Taxonomie lautet: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Saccharomyceta, Pezizomycotina, Leotiomyces, Sordariomyceta, Leotiomyces, Helotiales, Helotiaceae, *Hymenoscyphus* (Kowalski, 2006, Queloz et al., 2011). Er bildet, wie *H. albidus* kleine weiße Fruchtkörper in Form von Apothezien auf den abgefallenen Blattspindeln von *Fraxinus excelsior* (Abb. 2.7).

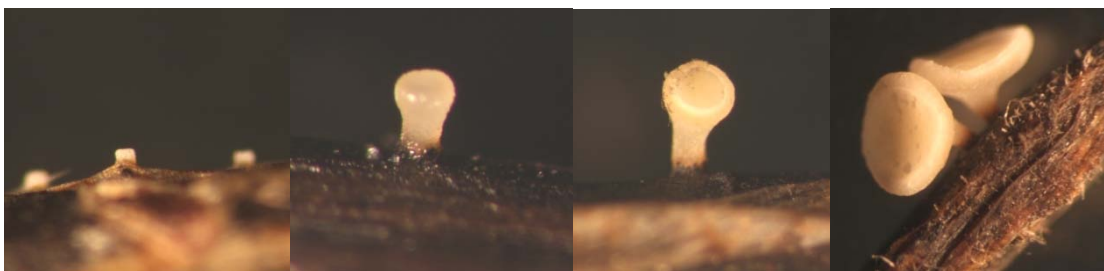


Abbildung 2.7: Entwicklungsabfolge von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* auf einem Eschenblattstiel. Fotos C. Eickhorst

Darin reifen die Ascosporen heran, die sehr flugfähig sind und mit dem Wind verbreitet werden. Hierzu gemachte Sporenflugexperimente zeigten, dass der größte Sporenflug morgens auftritt, daraus schlussfolgernd, dass die Sporenreifung überwiegend nachts stattfindet, wenn die Luftfeuchtigkeit hoch ist (Timmermann et

al., 2011). Ein von Gross et al. (2012b) skizzierter Entwicklungszyklus von *H. p.* zeigt hypothetisch, wie die Sporen die Pflanze infizieren (Abb. 2.8). Demnach bilden die windverbreiteten Sporen auf den Blättern der Esche ein Appressorium aus mit dem sie die Blätter penetrieren. Nach erfolgreicher Kolonisierung breitet sich der Pilz in den Petiolen aus, wo es nach dem Blattabfall zur Produktion von asexuellen Konidien kommt, welche vermutlich als Spermarien im Befruchtungsprozess dienen. Sich im darauffolgenden Sommer entwickelnde Apothecien initiieren mit der Produktion von Ascosporen den Zyklus erneut.

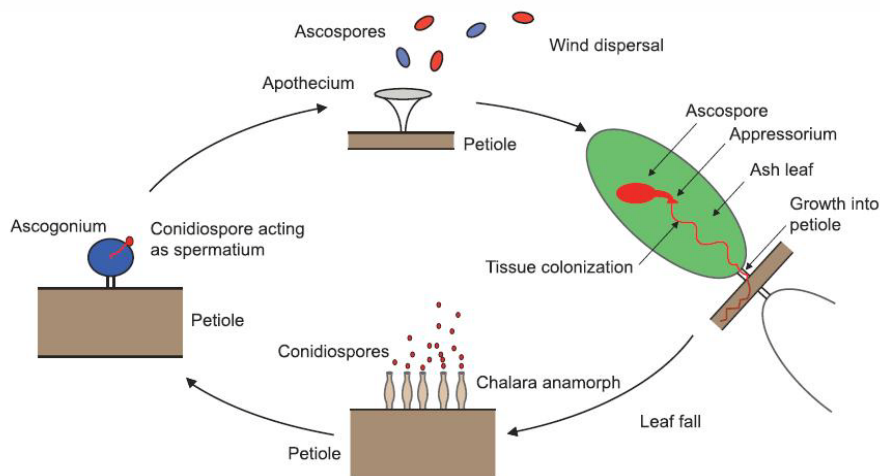


Abbildung 2.8: Hypothetischer Entwicklungszyklus von *H. p.*, aus Gross et al., 2012b.

Ökologisch besetzen *H. p.* und seine Schwesterart *H. a.* die gleiche Nische, weshalb eine Verdrängung der indigenen Art *H. a.* stattfindet (McKinney et al., 2012b). Allein genetische Studien, basierend auf ITS-Analysen, ISSR-Fingerprinting und Mikrosatelliten-Marker, resultieren in einer eindeutigen Differenzierung zwischen den Arten (Husson et al., 2011, Queloz et al., 2011, Bengtsson et al., 2012, Gross et al., 2012a). Weitere Unterschiede zeigen sich in der Biologie der beiden Arten. So konnten McKinney et al. (2012b) mit Inokulationsversuchen mit Myzel an Holzstücken zeigen, dass nur die Art *H. p.* in der Lage ist, diese zu infizieren. Das spiegelt sich auch in den Fundorten der Arten wieder, wonach *H. p.* nur in Gebieten mit erkrankten Eschen vorkommt, *H. a.* hingegen nur in symptomfreien (Queloz et al., 2011, McKinney et al., 2012b). Versuche, den hohen Infektionserfolg von *H. p.* zu erklären, gelangen bisher nur bedingt. Die genetische Variation des teleomorphen

Stadiums ist gering, *H. p.* weist eine nur geringe Allelendiversität auf (Gross et al., 2012a) und damit verbunden einen geringen Polymorphismus. Trotzdem kann sich diese Art gegen *H. a.* durchsetzen und eine immer größer werdende Anzahl von Eschen infizieren. Ein anamorphes Stadium konnte bisher nur bei *H. p.* gefunden werden, somit scheint ein asexuelles Stadium bei *H. a.* zu fehlen (Kirisits und Kräutler, 2013). Der Anamorph von *H. p.* (früher *Chalara fraxinea*) weist im Gegensatz zum Teleomorph eine hohe genetische Variabilität auf, wie RAMS-Untersuchungen zeigten (Rytönen et al., 2011, Kraj et al., 2012). Mikrosatelliten-Marker zur genaueren Analyse von *H. p.* und *H. a.* zeigen, dass *H. p.* heterothallisch ist, demnach ein höherer Genfluss existiert, während *H. a.* homothallisch ist (Bengtsson et al., 2012, Gross et al., 2012b). Eine morphologische Differenzierung zwischen beiden Arten konnte jüngst gezeigt werden. Während die Fruchtkörper äußerlich sich sehr ähneln, zeigen mikroskopische Aufnahmen von Zhao et al. (2012), dass es an der Basis der Asci von *H. p.* zur Hakenbildung kommt, hingegen konnten diese Beobachtung bei Asci der Art *H. a.* nicht gemacht werden (White, 1944) (Abb. 2.9).

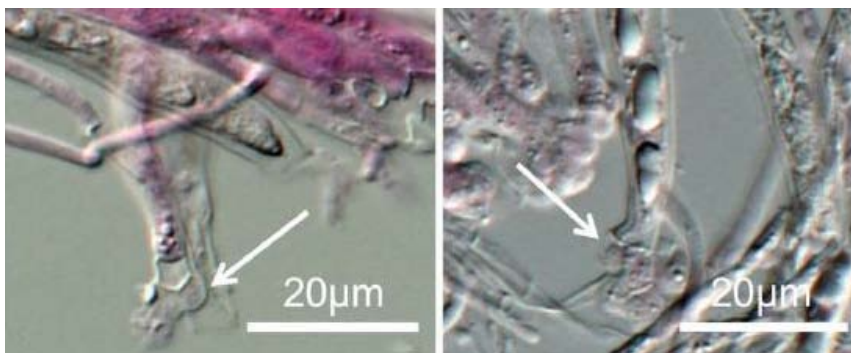


Abbildung 2.9: Aufnahmen von Hakenbildung an der Basis von Asci eines japanischen Isolates von *H. p.* (weiße Pfeile). Quelle Zhao et al. (2012).

2.3 Die Esche

Die Esche (*Fraxinus* spp.) ist mit über 40 Arten weltweit vertreten und nördlich des Äquators in der kühlgemäßigten Zone bis zu den Subtropen und zum Teil auch Tropen beheimatet (Abb. 2.10). Hauptverbreitungsgebiet ist Nordamerika und Ostasien mit jeweils 20 verschiedenen Arten. In Europa und Westasien sind drei Arten vertreten.

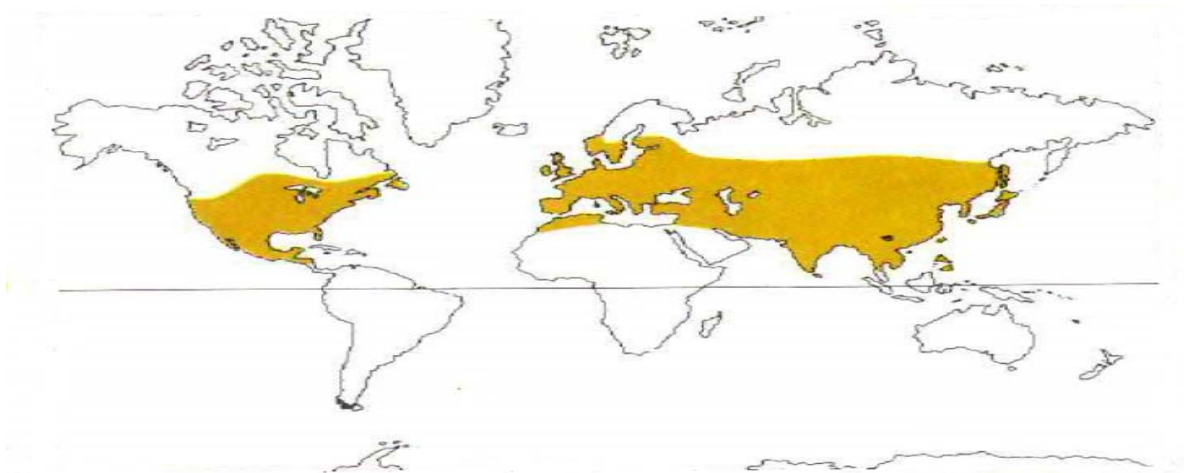


Abbildung 2.10: Verbreitung der Eschen (*Fraxinus* spp.) weltweit (gelbe Schattierung). Quelle: Hora, 1981)

Systematisch gehört die Gattung *Fraxinus* zur Familie der Ölbaumgewächse (*Oleaceae*) und diese wiederum zur Ordnung *Oleales* (Ölbaumartige) (Wallander 2008). *Fraxinus excelsior* L. wird im Deutschen als Gemeine oder Gewöhnliche Esche bezeichnet. Es ist eine mesophile Art, d.h. die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 20 und 42 °C (Marigo et al., 2000). Am besten gedeiht sie auf Schwemmlandböden, adaptiert sich aber auch gut an Berghängen mit zum Teil extrem trockenen Perioden. *F. excelsior* ist nur in Europa heimisch und ist klimatisch zwischen dem 38. und 64. Breitengrad Nord begrenzt. Nach Westen kommt sie bis Irland und nach Osten bis zum Ural vor (Marigo et al., 2000, Wardle, 1961). In Höhenlagen ist sie bis zu 1800 m (Kaukasus) zu finden (Roloff et al., 2010). Zu den Begleitbaumarten im Norden gehören Schwarzerle, Bergulme und Stieleiche, wo sie die Küstenwälder prägen (Fremstad, 1983, Diekmann, 1994, Tapper, 1996). Im Osten bildet sie zusammen mit Zitterpappel, Hängebirke, Gemeiner Hasel und Schwarzerle Bruch- und Auenwälder (Niinemets et al., 1998, Prieditis, 1999). In den Auenwäldern Zentraleuropas ist die Gemeine Esche, neben Schwarzerle und Feldulme, die dominierende Baumart (Falinski und Falinska, 1986). Die junge Esche ist eine schnellwüchsige Baumart, welche generell im Alter von 50 Jahren auf optimalen Standorten ihre Wuchshöhe von 40-45 m erreicht hat. Nicht selten wird sie zwischen 200 und 400 Jahre alt, einige frei stehende Arten sogar älter (Claessens et al., 1999, Collin und Badot, 1997). Die Geschlechtsreife erreicht sie erst mit 30-40 Jahren und produziert dann in hoher Quantität (140.000 Samen pro Baum) alle zwei bis drei Jahre Früchte, welche zwischen Juli und Oktober in

dichten Bündeln, an Ästen hängend, heranreifen (Abb. 2.11) (Collin und Badot, 1997). Während der Wintermonate werden die Samen mit dem Wind verbreitet und keimen erst im zweiten Jahr nach ihrer Verbreitung aus. Ihre geflügelte Form erlaubt ihnen Strecken zwischen 60 bis 125 m vom Mutterbaum entfernt zurück zu legen. Dank ihres hohen Phenolgehalts werden sie von potentiellen Fraßfeinden gemieden und haben eine mittlere Keimfähigkeit von 58%. Auch das abgeworfene Laub hat einen phytotoxischen Effekt, der das Wachstum anderer Pflanzen limitiert (Grime, 1979, Hulme und Borelli, 1999, Hulme und Hunt, 1999, Roloff et al., 2010). Durch ihren sehr anpassungsfähigen Wasserhaushalt sind Eschen konkurrenzfähig gegen Schattenbaumarten, wie der Buche, gegen die sie an ihrem eigentlich idealen Standort kaum Wachstumschancen hätten. Je nach Lebensphase hat *F. excelsior* andere Anforderungen ans Licht. Während die Samen und Jungpflanzen gut mit Schatten zurechtkommen, sinkt die Toleranz gegen Lichtmangel, je älter die Bäume werden. Im hohen Alter ist zudem eine absolut freie Krone zur vollen Entfaltung wichtig (Niinemets et al., 1998, Roloff et al., 2010, Tapper, 1996).

Fraxinus excelsior zeichnet sich in ihrer Jugend durch eine glatte, glänzend graue oder grünliche Rinde aus, die mit dem Alter werden ihr Erscheinungsbild zu einer rauen, dichtrissigen schwarzbraunen Borke verändert. Die Wuchsform des Stammes ist, ohne negative Einflüsse, gerade ohne Gabelungen. Gemessen an der Baumhöhe und abhängig von den Lichtverhältnissen sind ca. 60% des Stammes frei von Ästen (Roloff et al., 2010). Charakteristisch für die Art *F. excelsior* sind die im unbelaubten Zustand gut sichtbaren kohlschwarzen Knospen (Abb. 2.11) (Amann, 2011). Die unscheinbaren purpurnen und zumeist zwittrigen Blüten sind von April bis Mai vor dem Laubausbruch sichtbar. Die Blätter der Gemeinen Esche sind gefiedert und bei ausgewachsenen Bäumen 30x15 cm groß. Sie setzen sich aus mehreren Blättchen zusammen, die gegenständig an der Blattspindel angeordnet sind. Die Form der Blättchen ist elliptisch spitz zulaufend mit ungleichmäßig gesägtem Rand (Amann, 2011, Roloff et al., 2010).



Abbildung 2.11: Links: Astabschnitt einer Gemeinen Esche mit Fiederblättern und gebündelten Samen (braun). Rechts: Vergrößerung aus Abbildung 2.11, der rote Pfeil deutet auf eine Knospe. Fotos C. Junker

Neben Reinbeständen und in Mischwäldern ist die Esche eine häufig an Straßen und in Parks anzutreffende Baumart. Durch die guten Eigenschaften des Holzes, wie Härte und Elastizität, findet sie eine hohe Anwendung in der Industrie zur Herstellung von Sportgeräten, Werkzeuggriffen, Möbeln und Musikinstrumenten (Roloff et al., 2010).

Früher war *F. excelsior* trotz zahlreicher Pathogene, wie Bakterien (*Pseudomonas syringae* Janse), Pilzen (*Nectaria galligena* Bres., *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *Armillaria mellea*, *Inonotus hispidus*, *Phyllactinia corylea*) und Insekten (*Hylesinus fraxini*), nicht in ihrer Existenz bedroht (Butin, 1996, Hora, 1981, Roloff et al., 2010).

2.4 Pilz-Wirt Interaktion

Pflanzen interagieren mit einer Vielzahl von Mikroorganismen, unter anderem mit endophytischen und pathogenen Pilze. Normalerweise haben pflanzliche Zellen die Fähigkeit zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu differenzieren. Dieses Erkennungssystem, auch als angeborenes Immunsystem bezeichnet, hilft der Pflanze sich zu wehren (Nürnberger und Brunner, 2002; Panstruga und Ralph, 2006). Zur ersten Instanz der pflanzlichen Abwehr gegen Pathogene gehören sogenannte Elicitorrezeptoren. Sie sind fähig Elicitoren der Pathogene, Signalmoleküle, die die Pathogenabwehr stimulieren, zu erkennen (Scheel und Parker, 1990; Montesano et al., 2003; Nürnberger und Brunner, 2002). Im Falle einer Erkennung induzieren sie intrazelluläre Signalkaskaden, welche Abwehrreaktionen

auslösen (Montesano et al., 2003). Im Verlauf der Evolution ist es vielen Mikroorganismen gelungen, den Abwehrmechanismus zu unterbinden oder zu umgehen, was zur ungehinderten Kolonisierung und damit Erkrankung der Pflanzen führt, wie Joosten et al. (1997) am System *Lycopersicon esculentum* und *Cladosporium fulvum* zeigten. Zur pflanzlichen Abwehr gehören eine Reihe von Abwehrstoffen (Saponine, Phenole, Laktone) (Harborne, 1995; Nürnberger, 2003). Einige dieser Abwehrstoffe liegen in pflanzlichen Zellen als inaktive Vorläufer vor und können im Falle einer Infektion enzymatisch in biologisch aktive Antibiotika umgewandelt werden (Osbourn 1996; Morrissey und Osbourn, 1999; Mert-Türk, 2005). Einer solch chemischen Barriere sind Pilzpathogene direkt ausgesetzt, trotzdem gelingt es ihnen pflanzliches Gewebe erfolgreich zu besiedeln, wie im Falle von *H. p.* und seinem Wirt der Esche. Auch die Schwesterart *H. a.* produziert Sporen, welche es entweder nicht schaffen den Wirt zu besiedeln oder zur einer asymptomatischen Besiedlung führen. Im Gegensatz dazu sind die Sporen von *H. p.* in der Lage erfolgreich in die Pflanze einzudringen und lösen dort Krankheitssymptome aus. *H. p.* muss demnach tolerant gegen Abwehrstoffe des Wirtes sein oder ihnen entgegenwirken können. Zu den Strategien von Pathogenen gehören unter anderem angeborene Immunität und abbauende Enzyme, welche die antimykotische Wirkung pflanzlicher Substanzen herabsetzt (Morrissey und Osbourn, 1999). Infolge dessen geht bei der pathogenen Pilzinvasion das Kosten/Nutzen-Verhältnis zu Lasten des Wirtes (Erkrankung und eventuell Absterben der Pflanze). Eine Balance zwischen *H. p.* und der Esche könnte auch existiert haben, aber es ist nicht bekannt, inwiefern *H. p.* eine endophytische Phase (eine asymptomatische Besiedlung) hat oder zum Zeitpunkt der Infektion latent pathogen gewesen ist. Latent pathogene Pilze können in Abhängigkeit ihrer Wachstumsbedingungen (Wirtsalter, Substrat, klimatische Bedingungen) von endophytischer Lebensweise zu der eines Pathogen wechseln (Ernst, 2005). Verschiebt sich das sensible Gleichgewicht zwischen Pilz und Pflanze durch eine erhöhte Aggressivität des Pilzes oder einer Schwächung der Pflanzenabwehr zu Gunsten des Pilzes, kann es zur Erkrankung des Wirtes kommen (Schulz et al., 2002). Von außen betrachtet, kann nicht beurteilt werden, ob bei dieser Interaktion Metabolite produziert werden (Schulz et al., 1998). Auch die während der Interaktion von *H. p.* und der Esche sezernierten Metabolite, aber auch Exoenzyme sind nicht

bekannt, gelten aber als potentielle Virulenzfaktoren und sind deshalb Gegenstand unserer Untersuchungen.

2.5 Endophyten

Um den Begriff Endophyten definieren zu können, muss man sich die Studien vergangener Jahre vor Augen führen. De Bary (1866), schon oft zitiert, war wohl einer der ersten, welcher den Begriff Endophyt verwendete, um die in der Pflanze lebenden Pilze (Endophyten) denen die nur auf der Oberfläche parasitieren (Epiphyten), gegenüberzustellen. Heute ist man sich weitgehend einig, dass der Begriff nur Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) umfasst, die zeitweise oder ein Leben lang in gesundem Pflanzengewebe leben, ohne äußerlich erkennbare Infektionen zu verursachen (Saikkonen et al., 1998; Maheshwary, 2006). Zeitweise werden auch pathogene Pilze zu den Endophyten gezählt, da auch sie aus gesund aussehenden Pflanzen isoliert werden können (Schulz et al., 1993 und 1998). Endophytische Pilze gelten als mögliche symbiontische Partner von Pflanzen, allerdings können sie je nach Wirtsart positive oder keine Effekte auf die Pflanze ausüben (Redman et al., 2001). Zwischen Endophyten und dem Wirt besteht ein Gleichgewicht zwischen der Virulenz des Pilzes und pflanzlicher Abwehr. Dieser Zustand, ein ausbalancierter Antagonismus, erfordert, dass beide Partner über Mechanismen verfügen, um sich gegenseitig zu kontrollieren (Schulz et al., 1999).

Für eine erfolgreiche Besiedlung des Wirtsgewebes durch den Endophyten muss der Pilz, wie ein Pathogen, die äußere Barriere der Pflanze, die Zellwand, überwinden (Stone und Petrini, 1997). Dies gelingt nur durch mechanische Beschädigung oder durch enzymatischen Abbau (Petrini, 1992). Mit der Untersuchung der *in vitro* abgegebenen Enzyme einiger Pilze konnte gezeigt werden, dass Endophyten in der Lage sind extrazelluläre Cellulasen zu bilden, welche die Zellwandbestandteile der Pflanze verwerten (Carroll und Petrini, 1983; De Lorenzo et al., 1997; Peters, 1997; Boyle et al., 2001). Laut Demain (1980) produzieren Pilze nur Metabolite, die für den Pilz in der Wirt-Interaktion von Vorteil sind. Wie von Schulz und Boyle (2005) zusammengefasst können Endophyten zur Überwindung pflanzlicher Barrieren spezielle Strukturen (Haustorien, Appressorien, Penetrationshyphen) ausbilden, um den Wirt zu kolonisieren. Appressorien werden auch von *H. p.* ausgebildet, um in die Blätter ihres Wirtes einzudringen (Gross et al., 2012b).

Endophytische Pilze produzieren zudem eine Reihe von Stoffen (Mycotoxine, Antibiotika, Herbizide) (Dreyfuss und Chapela, 1994; Krohn, 1994a, b; Schulz et al., 1995, 1996), welche aus dem Sekundärstoffwechsel der Pilze stammen (Kettering et al., 2004). In gleicher Weise müssen Pathogen wie *H. p.* solche Metabolite produzieren. Studien von Kowalski und Bartnik (2010) und Andersson et al. (2012, 2013) konnten bereits zeigen, dass vom Anamorph von *H. p.* die Steroide Viridin und Viridiol produziert werden, deren Phytotoxis eine Rolle beim Eschentriebsterben zu spielen scheint. Die Produktion solcher Stoffe (Krohn et al., 1994a, b, 1996; Schulz et al., 1995) dient vermutlich zum Teil der Ausbreitung des Pilzes im Pflanzengewebe (Peters, 1997), zur Verteidigung des eigenen Lebensraumes gegen andere Mikroorganismen (Carroll, 1988), im Falle der Endophyten aber auch zur Unterstützung des Wirts durch Erhöhung der Toleranz bei Trockenheit und Nährstoffmangel (Krohn et al., 1996). Allerdings ist die Produktion von Sekundärmetaboliten abhängig vom Entwicklungsstadium und dem Ernährungsstatus des Pilzes (Bu'Lock, 1975; Calvo et al., 2002).

Die meisten Endophyten gehören zu den Ascomyceten (Carroll, 1988). Sie besiedeln Wurzeln und oberirdische Pflanzenteile und sind ubiquitär in fast allen Pflanzenarten vertreten (Saikkonen et al., 1998). Dies zeigt ihre vielfältigen Assoziationsfähigkeiten mit einer Vielfalt von Pflanzenarten. Dabei besiedeln sie oft die gleichen oder verwandten Pflanzen, wie pathogene Pilze. Dieses Verhalten deutet darauf hin, dass Endophyten aus Pathogenen (oder umgekehrt) evolviert und somit nahe Verwandte pathogener Arten sind (Isaac, 1992). Auch Guske (1995) konnte zeigen, dass sich Gattungsspektren von Endophyten und Pathogenen überschneiden. Dieses breite Wirtsspektrum trifft vor allem auf Endophyten in holzigen Pflanzen zu. Aus der Esche wurden ebenfalls neben *H. p.* zahlreiche andere Pilzarten isoliert (Bakys et al., 2009 a, b), die bisher aber aufgrund der geringen Frequenz mit der sie isoliert wurden, nicht als Pathogene im Zusammenhang mit dem Eschentriebsterben gesehen werden. Diese Pilze gehören zur natürlichen Lebensgemeinschaft des Baumes. Ihnen gilt mein Interesse bei der Suche nach einem geeigneten Antagonisten für *H. p.*, welcher entweder diesen direkt zurück drängt durch Besetzung der ökologischen Nische oder indirekt, durch Erhöhung der Pflanzenabwehr oder Produktion eigener antimykotischer gegen *H. p.* gerichteter Substanzen.

2.6 Ziele der Promotion

In Deutschland sind die Rückmeldungen über das Auftreten der Krankheit mittlerweile nahezu flächendeckend. Aus diesem Grund ist es das Ziel dieser Studie, möglichst umfassend zur Aufklärung der Pathogenese von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* beizutragen. Die Aufklärung der Infektionsbiologie und der Virulenz sind dabei von ebenso großer Bedeutung, wie die Identifizierung der Faktoren, die zur Ausbildung der Virulenz von *H. pseudoalbidus* führen.

Weiterhin sollen ausführliche morphologische, mikroskopische sowie histologische Kenntnisse über den, im hohen Maß Eschenbestände reduzierenden Ascomyceten gewonnen werden. Nebstdem sollen, wenn möglich, präventive und/oder kurative Maßnahmen entwickelt werden. Dazu finden Untersuchungen mit potentiell antagonistischen Pilzendophyten, als auch mit bereits erhältlichen und für ihre fungizide Wirksamkeit bekannten Substanzen, statt.

3. Material und Methoden

3.1 Nährmedien, Lösungen und Puffer

Die Sterilisation erfolgte, wenn erforderlich, im Autoklaven für 20 min. bei 121°C und 1 bar Überdruck. Hitzeempfindliche Substanzen wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren den auf 40°C abgekühlten Medien zugesetzt.

Kartoffel-Möhre-Agar (KM) (nach Booth, 1971)

20 g Kartoffeln (geschält und klein geschnitten)

20 g Möhren (klein geschnitten)

1000 mL Aqua dest.

Kartoffeln und Möhren werden in 500 mL Wasser für eine Stunde gekocht und danach das Filtrat durch ein Feinsieb gepresst. Das Filtrat wird mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt, 12 g Agar-Agar zugegeben und das Medium autoklaviert.

5% Biomalz-Agar (BM)

50 g Biomalz

15 g Agar-Agar

1000 mL Aqua dest.

pH 5.6

Dinkel-Gerste-Medium (DiGe)

200 g Gerste

200 g Dinkelflocken

2 g Sojapepton

1 mL MnCl₂ Stammlösung

250 mL VE-Wasser

Das Sojapepton mit der MnCl_2 - Lösung und dem Wasser verrühren. Die Lösung zu den vermischten Getreidekörnern geben und gut durchmengen. Pro Babyglas werden 24 g des Mediums eingewogen und mit einem Kunststoffdeckel mit Membran ($d = 2$ cm) verschlossen und autoklaviert.

Eschenblatt-MPY-Agar (EM) (modifiziert nach persönl. Mitteilung Kirisits)

50 g Eschenblätter

20 g Malzextrakt

2.5 g Hefeextrakt

2.5 g Pepton aus Casein

1000 mL VE-Wasser

16 g Agar-Agar

Malzextraktagar (MEA)

15 g Malzextrakt

1000 mL Aqua dest.

15 g Agar-Agar

pH 5.6

CP-Agar

10 g Hefeextrakt

10 g D(+)Glucose

1000 mL Aqua dest.

15 g Agar-Agar

pH 6.2

Cellulose Basal Medium (CBM) mit gefärbter Cellulose (modifiziert nach Pointing, 2000)

10 g Glucose

1 g Pepton

0.1 g Hefeextrakt

1000 mL Aqua dest.

16 g Agar-Agar

pH 6.0

Celluloseschicht (nach Ng und Zeikus, 1980):

0.5g gefärbte Cellulose

50 mL CBM

Für die Cellulosefärbung werden 10 g mikrokristalline Cellulose in 100 ml 50 mM Natriumsulfatlösung (wasserfrei) gelöst und mit 100 ml 1% Remazol Blue R Lösung für 30 min. bei 60 °C gerührt. Währenddessen werden der Lösung 20 g Na₂SO₄ (wasserfrei) zugesetzt. Anschließend wird der pH-Wert mit 5% Na₃PO₄ auf 12 eingestellt, um den Farbstoff an der Cellulose zu fixieren. Nach weiterem Rühren für 30 min bei 60 °C wird die gefärbte Cellulose durch einen Whatman Filter No.1 filtriert und anschließend mit 200 ml warmer (55°C) 1% Na₂CO₃-Lösung gespült. Es folgen weitere Waschschrte mit warmem Leitungswasser bis das Filtrat klar ist. Nach zwei letzten Waschschrten mit Methanol und Aceton wird die Cellulose getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Lignin Modifying Enzym Basal Medium (LBM) (modifiziert nach Pointing, 2000)

2 g Glucose

0.1 g Pepton

0.01 g Hefeextrakt

1000 mL Aqua dest.

16 g Agar-Agar

pH 6.0

Esculin-Eisen-Agar (EEA)(modifiziert nach Pointing, 2000)

1000 mL CBM

5 g Esculin

pH 6.0

Stärke-Nitrat-Agar (SNA) (nach Krainsky, 1914)

10 g Stärke

3 g KNO_3

0.5 g K_2HPO_4

1000 mL Aqua dest.

15 g Agar-Agar

pH 6.2

Tween-20-Agar (nach Sierra, 1957)

10 g Pepton

5 g NaCl

0.1 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

1000 mL Aqua dest.

20 g Agar-Agar

pH 6.0

10 mL Tween-20 (separat autoklavieren und steril zum Medium geben)

Tanninsäure-Agar (nach Nobles, 1965)

15 g Malzextrakt

5 g Tanninsäure

1000 mL Aqua dest.

20 g Agar-Agar

pH 5.6 - 6.5

H_2O -Agar 1L (nach Raquin et al., 2002)

Makronährstoffe:

5 mM NH_4NO_3

7,5 mM KNO_3

1,5 mM MgSO_4

1,5 mM CaCl_2

2 mM KH_2PO_4

0,5 mM K_2HPO_4

0.1 mM FeEDTA

Mikronährstoffe:

die Hälfte der Konzentration der Mikronährstoffe nach Murashige und Skoog (1962)

0,2% Phytigel

0.4% Agar-Agar

H₁₀-Agar 1L (nach Raquin et al., 2002)

H₀-Agar

14 mM Sucrose

14 mM Maltose

50x TAE-Puffer pH 8.5

242 g Tris-Base

57.1 mL Eisessig

100 mL 0.5M EDTA (pH 8.0)

auf 1000mL mit VE-Wasser auffüllen.

Ethanol-Eisessig-Formaldehyd (AFE-Fixierlösung)

900 mL 70% Ethanol (v/v)

50 mL 37% Formaldehyd (v/v)

50 mL 100% Essigsäure (v/v)

Präinfiltrationslösung Technovit[®]7100 (1:1)

50 mL Basislösung Technovit[®]7100

50 mL 96% Ethanol (v/v)

Infiltrationslösung Technovit[®]7100 (Vorbereitungslösung)

100 mL Basislösung Technovit[®]7100

1 g Härter I Technovit[®]7100

Polymerisationslösung Technovit®7100

15 mL Vorbereitungslösung Technovit®7100

1mL Härter II Technovit®7100

Aufblockmittel Technovit®3040

Anmischen von zwei Teilen Technovit® 3040 Pulver mit einem Teil Technovit® 3040 Flüssigkeit.

3%ige NaClO-Lösung

200 mL autoklaviertes VE-Wasser

87 mL 10%ige NaClO

0.2%ige Ca(ClO)₂

100 mL VE-Wasser

0.2 g Ca(ClO)₂

2%ige Ca(ClO)₂

100 mL VE-Wasser

2 g Ca(ClO)₂

Methanol-Aceton 1:1

250 mL Methanol

250 mL Aceton

4% Methanol in Dichlormethan

4 mL Methanol

96 mL Dichlormethan

Trypanblau-Färbelösung

0.5 g Trypanblau

500 mL Glycerol

450 mL H₂O

50 mL HCl

3.2 Pilzstämme

Die in Tabelle 3.1 aufgelisteten Isolate von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* C398 bis C548 und aus der Stammsammlung des JKI (Julius-Kühn-Institut) Braunschweig zu Verfügung gestellt, wurden in eine eigene Stammhaltung überführt (Kap. 3.5). Die Isolate stammen aus erkranktem Gewebe. Die Isolate Es 20d bis EL 122 stammen von selbst durchgeführten Pilzisolierungen aus Eschenzweigen (*Fraxinus excelsior*) aus dem Forst Elm.

Tabelle 3.1: Verwendete Isolate von *Hymenoscyphus* spp..

Sammlungsnummer	Taxon	Identifiziert durch	Ursubstrat	Ort des Isolates
C 398	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> (Einsendung Uni HH)	Hamburg
C 399	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> (Einsendung Uni HH)	Hamburg
C 400	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> (Einsendung Uni HH)	Hamburg
C 401	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	unbekannt	unbekannt
C 402	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus angustifolia</i> , Trieb	Hamburg
C 403	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus angustifolia</i> , Trieb	Hamburg
C 404	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3 jährig von Sämlingen 1/2	Baumschule Grellck, Haltenbeck/Pinneberg
C 405	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3 jährig von Sämlingen 1/2	Baumschule Grellck, Haltenbeck/Pinneberg
C 406	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3 jährig von Sämlingen 1/2	Baumschule Grellck, Haltenbeck/Pinneberg
C 407	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3 jährig von Sämlingen 1/2	Baumschule Grellck, Haltenbeck/Pinneberg
C 408	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 409	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 410	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 411	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 412	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 413	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 414	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen

C 415	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 416	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus angustifolia</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 417	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus angustifolia</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 418	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus angustifolia</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 419	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus angustifolia</i> , Zweige mit Nekrosen	Uelzen
C 420	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , einjähr. Sämling, Aussaat Frühj. 2007; Holz v. Triebstücke braun + Übergang grün+ Nekrose	25337 Seeth Ekholt, Kr. Pinneberg
C 421	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , einjähr. Sämling, Aussaat Frühj. 2007; Holz v. Triebstücke braun + Übergang grün+ Nekrose	25337 Seeth Ekholt, Kr. Pinneberg
C 422	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , einjähr. Sämling, stärkere braune Zweigstückchen, Holz	Betrieb Torsten Perrau, Rellingen
C 423	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , einjähr. Sämling, stärkere braune Zweigstückchen, Holz	Betrieb Torsten Perrau, Rellingen
C 424	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , einjähr. Sämling, dünnere grün-braune Zweigstückchen, Holz	Betrieb Torsten Perrau, Rellingen
C 425	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , einjähr. Sämling, dünnere grün-braune Zweigstückchen, Holz	Betrieb Torsten Perrau, Rellingen
C 426	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 4-jähr. Sämling, Verfärbter Holzbereich nach Rindenentfernung	Betrieb Torsten Perrau, Rellingen
C 427	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 4-jähr. Sämling, Verfärbter Holzbereich nach Rindenentfernung	Betrieb Torsten Perrau, Rellingen
C 428	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Nekrosen an oberirdischen Teilen	Ostpolen, Forstdirektion Lublin, Oberförsterei Mircze
C 429	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Nekrosen an oberirdischen Teilen	Ostpolen, Forstdirektion Lublin, Oberförsterei Mircze
C 430	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Nekrosen an oberirdischen Teilen	Ostpolen, Forstdirektion Lublin, Oberförsterei Mircze

C 431	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Jungpflanzen in Baumschule Herbst 07 bis 03/08 eingeschlagen	Baumschule Albert Brandt, Prisdorf (HH)
C 432	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Naturverjüngung	Ölper Braunschweig Holz,
C 433	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Naturverjüngung	Ölper Braunschweig Holz,
C 434	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Anpflanzung	Revier Königslutter, Elm
C 435	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Anpflanzung	Revier Königslutter, Elm
C 436	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i>	Richtenberg bei Rostock (Meck.Pom.)
C 437	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i>	Richtenberg bei Rostock (Meck.Pom.)
C 438	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus</i>	Hamburg (Billwerder)
C 439	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i>	Berlin
C 441	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Jungpflanzen	Haiming, SO-Bayern (Grenze)
C 442	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Jungpflanzen	Haiming, SO-Bayern (Grenze)
C 443	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Jungpflanzen	Haiming, SO-Bayern (Grenze)
C 444	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , "Westhof's Glory", eigene Veredelung, Stammstück	Baumschule Hobohm, Nauen, Brandenburg
C 445	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Sämling Frühj. 08, Triebspitze (Nekrose)	Baumschule Hobohm, Nauen, Brandenburg
C 446	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , Altbestand, Stockaustrieb	Nauen, Am Kuhdamm (Brandenburg)
C 447	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> "Westhof's Glory", 3jähr. Veredelung, Rinden- + Splintnekrosen	Nauen, An den Rohrwiesen, Havell. Radwanderweg (Brandenburg)
C 448	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> "Pendula"	156
C 449	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 450	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 451	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 452	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 453	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 454	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop

C 455	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 456	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 457	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 458	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 459	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 460	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 461	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 462	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 463	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 464	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 465	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 466	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 467	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 468	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 469	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 470	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 471	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 472	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 473	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 474	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 475	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 476	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 477	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop

C 478	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 479	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 480	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 481	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 482	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 483	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 484	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 485	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 486	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 487	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 488	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 489	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 490	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 491	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 492	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 493	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 494	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 495	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 496	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 497	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 498	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 499	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 500	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 501	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop

C 502	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 503	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 504	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 505	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 506	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 507	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 508	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 509	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 510	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 511	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 512	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 513	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 514	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 515	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 516	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 517	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 518	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 519	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 520	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 521	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 522	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 523	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 524	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 525	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop

C 526	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 527	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 528	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 529	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 530	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 531	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 532	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 533	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 534	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 535	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 536	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 537	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 538	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 539	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 540	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 541	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 542	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 543	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 544	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 545	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 546	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 3j. Sämling aus Baumschule	Ellerhoop
C 547	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 2.-3. Standjahr, nicht verschult	Baumschule Gera, Auenboden
C 548	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	J. Schumacher	<i>Fraxinus excelsior</i> , 2.-3. Standjahr, nicht verschult	Baumschule Gera, Auenboden
Es 20d	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i>	Ellerhoop

Es 60c	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i>	Ellerhoop
Es 89a	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i>	Ellerhoop
EL 100	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 101	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 102	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 103	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 104	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 105	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 106	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 107	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 108	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 109	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm
EL 110	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Erkerode, Forst Elm

EL 111	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 112	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 113	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 114	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 115	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 116	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 117	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 118	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 119	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 120	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 121	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,
EL 122	<i>Hymenoscyphus</i> spp.	S. Draeger	<i>Fraxinus excelsior</i> , aus Übergängen zw. gesunden und nekrotisiertem Gewebe im Inneren der Zweige	Region Forst Elm	Erkerode,

Die in Tabelle 3.2 aufgelisteten Isolate von *Hymenoscyphus albidus* wurden von Prof. Dr. Holdenrieder von der ETH in Zürich und PD Dr. Kirisits von der Universität für Bodenkultur in Wien zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.2 Verwendete Isolate von *Hymenoscyphus albidus*.

Sammlungsnummer	Taxon	Identifiziert durch	Ursubstrat	Ort des Isolates
090812.3a	<i>Hymenoscyphus albidus</i>	O. Holdenrieder	Fruchtkörper	Leukerbad, CH N46°22'55.3'' E07°37'20.1''
Car1	<i>Hymenoscyphus albidus</i>	T. Kirisits	Pseudosklerotium auf Eschenblattstielen	Carnac, F N47°37'25.6'' W03°04'20.6''
Car5	<i>Hymenoscyphus albidus</i>	T. Kirisits	Pseudosklerotium auf Eschenblattstielen	Carnac, F N47°37'25.6'' W03°04'20.6''
Car6	<i>Hymenoscyphus albidus</i>	T. Kirisits	Pseudosklerotium auf Eschenblattstielen	Carnac, F N47°37'25.6'' W03°04'20.6''
Car7	<i>Hymenoscyphus albidus</i>	T. Kirisits	Pseudosklerotium auf Eschenblattstielen	Carnac, F N47°37'25.6'' W03°04'20.6''

Die in Tabelle 3.3 aufgelisteten Stämme sind 64 Pilzendophyten, welche von Oktober 2008 bis Juli 2009 aus Zweigen, Blättern und den Blattrippen von der gemeinen Esche isoliert worden. Die beprobten Pflanzen zeigten keine als auch erste Krankheitssymptome und stammen vom Elm, nahe Erkerode (52° 12' 03" N 10° 43' 07" E).

Tabelle 3.3: Verwendete Pilzendophyten isoliert aus symptomfreien und erkrankten Eschen (*Fraxinus excelsior*) aus dem Reitlingstal, Elm.

Stammnummer	Taxon	Ursubstrat
9936	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
9937	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
9938	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
9939	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
9941	<i>Stagonospora</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
9942	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
9943	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Blatt
9944	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Blatt

9946	<i>Septoria</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Blatt
9947	<i>Colletrichum</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Blatt
9952	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9953	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9954	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9955	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9956	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9957	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9958	<i>Septoria</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , schwach nekrotischer Zweig
9959	n.b.	stark nekrotischer Zweig, Blatt von <i>Fraxinus excelsior</i>
9960	Ascomycet	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, braune Rinde
9961	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, braune Rinde
9962	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, braune Rinde
9963	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9964	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9965	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9966	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9967	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9968	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9969	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9970	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9971	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9972	<i>Stagonospora</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde

9973	<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9974	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9975	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9976	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9977	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig, grüne Rinde
9978	<i>Microdiplodia</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , grüner Zweig mit Nekrosen
10006	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
10007	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
10008	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
10009	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
10010	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
10011	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , gesunde Pflanze, Zweig
10012	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Euonymus europaeus</i>
10013	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig
10014	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig
10015	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig
10016	<i>Seimatosporium falcatum</i>	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig
10024	<i>Libertella</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Blattfiedern
10025	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Blattfiedern
10028	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Blattrippen
10029	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Blattrippen
10030	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Blattrippen
10049	<i>Nodulisporium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10051	<i>Geniculosporium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10052	<i>Geniculosporium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig

10054	<i>Libertella</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10056	<i>Coniothyrium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10059	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10062	<i>Phoma</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10066	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Spitzenwelke, Zweig
10274	<i>Cladosorium</i> sp.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Kontamination an der Laborkultur
10275	n.b.	<i>Fraxinus excelsior</i> , Zweig
10290	<i>Acremonium</i> sp.	Umweltisolat

n.b. nicht bestimmbar

3.3. Verwendetes Saatgut

Für Infektionsstudien mit *H. p.* an Pflanzensämlingen wurden die in Tabelle 3.4 aufgelisteten Sämereien verwendet. Die Kultivierung bei allen axenischen Pflanzenversuchen erfolgte stets bei 20 °C und 8 h Licht (800 x 10 Lux) in speziellen Klimaräumen und Kammern.

Tabelle 3.4: Verwendetes Saatgut für Pflanzeninfektionsversuche mit *H. pseudoalbidus*.

Art	Eigenschaft/Sorte	Herkunft
<i>Fraxinus excelsior</i> (L.)	autochthon	Forstsaatgut-Beratungsstelle, Niedersächsische Landesforsten, Munster-Oerrel
<i>Ocimum basilicum</i> (L.)	Genoveser	Saatgut Fa. Mayer's
<i>Agrostis stolonifera</i> (L.)	Penn A4	Julias Wagner GmbH Samenzucht Samengroßhandel, Heidelberg

3.4 Isolierung von *H. pseudoalbidus* und Pilzendophyten

Zur Isolierung von *H. p.* bzw. endophytischen Pilzen wurden nekrotisierte und gesunde Zweige von *Fraxinus excelsior* oberflächensterilisiert. Dazu wurden die klein geschnittenen Zweige für 30 sec in 70% EtOH, für 1 min in 3% NaOCl und dreimal für 3 min in steriles Wasser getaucht. Anschließend wurden für die Isolierung

von *H. p.* mit einem Skalpell kleine Stücke aus dem Übergangsbereich zwischen gesundem und nekrotisierten Gewebe im Inneren der Zweige heraus geschnitten und auf KM-Agar (Kap. 3.1) ausgelegt. Um Endophyten zu isolieren wurde Gewebe aus gesunden Zweigen entnommen und in gleicher Weise auf KM-Agar ausgelegt. Die Kultivierung des entnommenen Pflanzenmaterials erfolgte bei RT in Milbenfallen. Nach einigen Wochen konnten erste Isolate von *H. p.* und den Endophyten in Reinkultur überimpft und bestimmt werden.

3.5 Stammhaltung

Eine permanente Kultivierung der einzelnen Stämme von *H. pseudoalbidus* sowie der Endophyten erfolgte in Schrägröhrchen auf KM-Agarmedium (Kap. 3.1). Hierzu wurde ein kleines Stück Myzel auf das Medium überimpft und bis zum Anwachsen des Pilzes bei RT kultiviert. Anschließend wurde der Rand der Aluminiumkappe des Kulturröhrchens zum Schutz vor dem Austrocknen mit Parafilm verschlossen und bei 8 °C gelagert. Für die Versuche wurden die benötigten Pilze auf Petrischalen mit dem für den Versuch geeigneten Agarmedium überimpft. Deren Kultivierung erfolgte bei RT in Milbenfallen.

3.6 Morphologieuntersuchungen

Für die morphologische Charakterisierung der Stämme wurden diese auf den Medien Biomalzagar und Kartoffel-Möhre-Agar (Kap. 3.1) in Petrischalen (d=9cm) kultiviert und anschließend makroskopisch und mikroskopisch ausgewertet. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Bilder mit einer Digitalkamera von Casio vom Typ Ex-Z 750 (7.2 Megapixel) erstellt.

3.6.1 Makroskopische Auswertung

Makroskopisch wurden Koloniefarbe und Beschaffenheit des Luftmyzels beschrieben. Für eine einheitliche Verwendung von Farbbeschreibungen wurde die Farbtabelle des RAL-Farbsystems (Venn und Venn-Rosky, 2010) verwendet. Zur Bestimmung der optimalen Wachstumstemperatur der Pilze, wurden einige Stämme bei 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C auf KM-Agar und BM-Agar kultiviert und anschließend das Temperaturoptimum durch vergleichen der Wachstumsgeschwindigkeit ermittelt (Beyerle, 2010). Daraufhin konnte die

Wachstumsgeschwindigkeit bei der ermittelten optimalen Temperatur für alle Stämme bestimmt werden. Hierfür wurde nach drei bis vier Wochen Kultivierung oder vollständigem Bewachsen der Petrischale der Radius des Myzels in vier verschiedene Richtungen bestimmt. Durch den daraus errechneten Mittelwert wurde die Anzahl der kultivierten Tage geteilt und damit die Wachstumsgeschwindigkeit in cm pro Tag ermittelt. Dies wurde für alle zur Verfügung stehenden Isolate von *H. p.* durchgeführt.

3.6.2 Mikroskopische Auswertung

Die Hyphendicke und -farbe sowie Sklerotienbildung und die Anwesenheit von Sporen wurden mit einem Zeiss-Axioskop (Vergrößerung 200x und 400x) untersucht.

3.6.3 Vegetative Kompatibilität

Bisher existierten kaum Erkenntnisse über die genetische Variationsbreite des Pathogens. Untersuchungen zum Auftreten von Rassen sind notwendig, nicht nur um eventuell endophytische und andere avirulente von pathogenen (virulenten) Isolaten unterscheiden zu können, sondern auch um nach resistenten Vertretern auf Seiten des Wirtes (*Fraxinus* spp.) suchen zu können. Vegetative Kompatibilität (vc) bedeutet, dass die Isolate Anastomosen miteinander bilden können und in den meisten Fällen auch Heterokaryons (u.a. Schafer & Kohn, 2007). Es setzt weiterhin voraus, dass die Isolate eines Klon nur wenige vc-Gruppen (vegetative compatibility groups) haben können. Wenn die Ascosporen aus den gebildeten Apothecien infolge Auszucht entstehen, ergibt sich eine Segregation von drei oder mehr Nachkommen unter den vc-Gruppen. Vegetative Kompatibilität gibt also Aufschluss darüber, ob Isolate genetisch ähnlich sind. Zusammen mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Analysen werden somit Aussagen über die Variabilität (Spektrum unterschiedlicher Stämme) und die Evolutionsgeschichte der Pilzart (neu entstanden/invasiv oder nativ/etabliert) möglich.

Hierzu wurden die Isolate von *H. p.* nach Schafer und Kohn (2006) in selbst-selbst und selbst-fremd-Interaktionen in Dualkultur auf mit roter Lebensmittelfarbe (75 µL/L) versetztem Kartoffel-Glucose-Medium in einem Abstand von 3 cm angeimpft und bei RT und Dunkelheit kultiviert und anschließend mit einem Mikroskop ausgewertet.

Unter optimierten Bedingungen wachsen die Isolate zusammen (Anastomosenbildung), ohne eine Demarkationslinie zu auszubilden. Gehören die Isolate zu unterschiedlichen vc-Gruppen, wachsen sie nicht zusammen und sind also nicht kompatibel, es entsteht eine rote Demarkationslinie zwischen ihnen.

3.7 Isolierung pilzlicher DNS

Für die Isolierung pilzlicher DNS wurden Flüssigkulturen (Kap. 3.10.1) der Isolate lyophilisiert (Kap. 3.10.2) und gemörsert. Zu etwa 40 mg des pulverisierten Myzels wurden 300 µL SDS und 4 µL RNase A gegeben und für 60 Min. bei 37°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurde mit der Isolation nach dem Protokoll des Isolierungskits NucleoSpin Plant II der Firma Macherey-Nagel (Kapitel 5.2, ab Behandlungsschritt mit Chloroform) gearbeitet und die DNS bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C eingefroren.

3.8 PCR und Sequenzierung

Mit der genomischen DNS der Isolate von *H. p.* (Kap. 3.7) wurde nach dem Protokoll von Husson et al., 2011 folgende PCR mit den von White et al. 1990 entwickelten pilzspezifischen Primer ITS1 und ITS 4 (Tab. 3.5) durchgeführt:

- | | | |
|----------------------------|----------------|-------------|
| 1) Initiale Denaturierung: | 95 °C, 3 min. | |
| 2) Annealing: | 50°C, 30 sec. | } 35 Zyklen |
| 3) Elongation: | 72 °C, 80 sec. | |
| 4) Denaturierung: | 95 °C, 15 sec. | |
| 5) Finale Elongation: | 72 °C, 10 min. | |

Tabelle 3.5 Liste der verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5'->3')	Referenz	Größe Produkt
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990	550 bp
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990	

Der Mastermix für einen einfachen PCR-Ansatz setzte sich aus denen in Tabelle 3.6 genannten Komponenten zusammen.

Tabelle 3.6: Pipettierschema (1x) für einen 50 µL PCR-Ansatz.

Komponenten Mastermix	Konzentration	Volumina [µL]	Endkonzentration
Phusion® GC Buffer	5x	10.0	1x
dNTPs	10 mM	1.0	0.2 mM
Primer Forward ITS 1	100 µM	1.0	10 µM
Primer Reverse ITS 4	100 µM	1.0	10 µM
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)	2,000 units/ml	0.5	1.0 unit
Template DNA		1.0	20 ng/µL
MilliQ H ₂ O		35.5	
Endvolumen		50.0	

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (QIAquick PCR-Purification Kit, Fa. QIAGEN, Hilden) und von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) nach der Methode Sanger sequenziert. Zudem wurden die PCR Produkte zur Überprüfung der richtigen Fragmentgröße auf ein Agarose-Gel (IMG, Fa. Applichem) aufgetragen (Tab. 3.7) und bei einer Spannung von 100V 35 min. bei RT laufen gelassen. Nach anschließender Färbung in einem Ethidiumbromidbad (1% in dH₂O) konnten die entstandenen Banden unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

Tabelle 3.7: Übersicht zu den verwendeten Reagenzien für die Gelelektrophorese, sowie die dafür eingesetzten Volumina

	Produkt	Hersteller	Volumina
Agarose	1% IMG	Applichem	≥400g/cm ²
Laufpuffer	1X TAE		variabel
Marker	1 kb DNA Ladder,	GeneOn	5 µL
Farbstoff	6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific Fermentas	1 µL
PCR-Produkt			5 µL

3.9 Exoenzymproduktion

Neben den sogenannten Sekundärmetaboliten gehören die Exoenzyme zu den wichtigsten Virulenzfaktoren der Pilze. Sie ermöglichen es ihnen nicht nur die in diesem Fall pflanzlichen Barrieren, wie Zellwand und -membran zu überwinden, sondern spielen auch eine bedeutende Rolle als Virulenzfaktoren bei der Infektion und Besiedlung ihres Wirtes.

Für einen qualitativen Nachweis der Exoenzyme, sowie der Erstellung eines Exoenzymprofils, wurden die Stämme auf das Vorhandensein von acht verschiedenen Enzymen getestet. Hierfür wurden in der Literatur bereits etablierte Testverfahren verwendet, welche mittels diverser Farbreaktionen in Spezialnährmedien die Synthese folgender Exoenzyme nachweisen sollten: Cellulase, β -Glucosidase, Laccase, Peroxidase, Polyphenoloxidase, Tyrosinase, Amylase und Lipase. Allen Enzymtests ging eine Kultivierung des entsprechenden *H. p.*-Stammes auf dem jeweiligen Medium voraus. Die Kultivierungsdauer war sowohl abhängig vom Medium, als auch vom verwendeten Stamm.

3.9.1 Cellulase

Cellulose, Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand, besteht aus unverzweigten Glucosemolekülen und dient vorwiegend der Statik von Pflanzengeweben. Zur Überprüfung der cellulolytischen Aktivität wurden Kulturröhrchen mit 7 mL CBM-Agar überschichtet mit 1 mL gefärbter Cellulose (Kap. 3.1) hergestellt und diese mit einem Stück Myzel beimpft. Wird die Cellulose abgebaut, so wird der an ihr gebundene Farbstoff frei gesetzt und kann in den sich darunter befindenden gelblichen CBM-Agar diffundieren (Thorn, 1993). Die Strecke der Diffusion wird gemessen und als Grad der Aktivität bestimmt.

3.9.2 β -Glucosidase

β -Glucosidase ist ebenfalls ein Enzym, welches für den Celluloseabbau in Pflanzen verantwortlich ist (Falbe & Regitz, 1996, Nakatsubo, 2001). Dessen Aktivität kann durch kultivieren des Pilzes auf einem esculinhaltigen Agar (Kap. 3.1), als einzige Kohlenstoffquelle, detektiert werden. Nach der Inkubation mit dem Pilz, zeigt sich bei einer positiven Reaktion eine schwarze Verfärbung um das Impfstück.

3.9.3 Laccase und Peroxidase

Lignine, wichtige Bausteine zur Verfestigung in der pflanzlichen Zellwand eingelagert, werden von zahlreichen pilzlichen Enzymen abgebaut. Zu den bedeutenden Enzymen beim Ligninabbau gehören die Laccase und Peroxidase. Zum Nachweis werden aus dem auf LME-Agar (Kap.3.1) gewachsenen Myzel rechteckige Vertiefungen geschnitten und für den Laccasenachweis einige Tropfen

0,1% Syringaldazin (Sigma) (in 95 % Ethanol) und für den Peroxidasenachweis einige Tropfen 0,1% Syringaldazin und 0,5% H_2O_2 (Pointing, 2000) gegeben. Ist Laccase vorhanden, so zeigt sich dies in einer pink bis violetten Färbung an den Rändern der Vertiefung. Der Peroxidase-Test, welcher ebenfalls in der genannten Verfärbung der Ränder auftritt, kann nur als positiv gewertet werden, wenn der Laccase-Nachweis negativ oder in der Farbintensität schwächer ausfällt (Pointing, 2000).

3.9.4 Polyphenoloxidase

Polyphenoloxidasen, eine Gruppe von kupferhaltigen Enzymen, zu denen Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Laccasen gehören (Solomon et al., 1992), ermöglichen es dem Pilz ebenfalls, das Lignin der pflanzlichen Zellwand zu lösen. Durch die Oxidation von Phenolen und Catecholen, unter Verwendung von molekularem Sauerstoff, entstehen chinoide Substanzen. Sie sind durchweg farbig und beispielsweise für die braune Verfärbung bei verletzten Pflanzen verantwortlich (Mayer, 2006). Aufgrund der von Bavendamm (1928) an holzerstörenden Pilzen gemachten Beobachtungen, dass infolge des Abbaus und der Oxidation von Tannin und Gallussäure dunkel gefärbte Produkte entstehen, ging er davon aus, dass dies auch Pilze tun, welche in der Lage sind, Lignin abzubauen. Zum Nachweis wurden die Pilze auf einem tanninsäurehaltigen Medium (Kap.3.1) kultiviert. Bildete sich um das Impfstück eine durch oxidierende Enzyme verursachte dunkle Zone (Chinone), so handelte es sich um einen ligninabbaufähigen Stamm (Lyr, 1958).

3.9.5 Tyrosinase

Da sich mit einem negativen Test auf Polyphenoloxidasen nicht das Vorhandensein von Tyrosinasen ausschließen lässt, wurde hierzu ein empfindlicher Tyrosinase-Nachweis nach der Methode von Lyr (1958) herangezogen. Die dafür auf Malzextraktagar (Kap.3.1) kultivierten Pilze wurden bei hinreichender Größe des Myzels mit einer Lösung von 10^{-2} mol p-Kresol (Sigma-Aldrich) und 0,05% Glykokoll (Merck) überschichtet. Unter Einwirkung der Testlösung wird die im Myzel vorhandene Tyrosinase freigesetzt. Bei einem positiven Nachweis kommt es zu einer Verfärbung des Reagens von Gelb über Orange bis zu einem kräftigen Rot.

3.9.6 Amylase

Der Stärkeabbau gehört, wie der von Lignin und Cellulose, zu einem der wichtigsten Fähigkeiten von Pilzen, um die in der Pflanze vorliegenden kompakten Speicherstoffe (Stärke), in für sie verwertbare Moleküle (Glucose) abzubauen. Dabei kommen Amylasen zum Einsatz, die die langen verzweigten Ketten von Glucosemolekülen der Stärke an ihren Glykosidbindungen spalten und abbauen. Zur Überprüfung der Amylaseaktivität wurden die Pilze auf Stärke-Nitrat-Agar (Kap. 3.1) kultiviert. Hatte das Myzel auf dem Agar eine ausreichende Größe erreicht, wurde es mit einer Jodjodkalium-Lösung (Merck) überflutet. Die noch im Medium vorhandene Stärke wurde durch die Jodlösung blau angefärbt, während eine gelbe Zone um das Myzel auf einen Stärkeabbau hindeutete.

3.9.7 Lipase

Um aktiv in intakte Pflanzenzellen einzudringen, nutzen phytopathogene Pilze neben den ligninabbauenden Enzymen auch lipolytische Enzyme (Agrios, 1997). Sie können auf einem speziellen Medium (Kap. 3.1) nachgewiesen werden, das unter anderen Tween-20 (Merck), einen Lipidstoff, enthält. Während der Kultivierung kann man bei positiver Reaktion die lipolytische Aktivität durch das Bilden von Calciumsalzkristallen im sonst klaren Agar erkennen.

3.10 Kulturextraktherstellung

Pilzkulturextrakte stellen eine erste Möglichkeit dar, um das Vorhandensein verschiedenster Sekundärmetabolite zu untersuchen. Dabei handelt es sich überwiegend um Substanzen, die chemischen Verbindungen wie Alkaloiden, Peptiden, Polyketiden und Terpenen angehören. Sie können eine wichtige Funktion bei der Wirt-Parasit-Interaktion haben und sind u.a. in ihrer Synthese abhängig von den dem Pilz zur Verfügung stehenden Nährstoffen.

3.10.1 Pilz-Flüssigkultur

Pro Pilzstamm wurden in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane und 50 mL sterilem flüssigen Medium mehrere kleine Pilzmyzelstücke, von dem zuvor auf Agarmedium kultivierten Pilz, überimpft. Die Kultivierung erfolgte für ca. zwei

Wochen bei 20 °C auf einem Schüttler mit 90 rpm. Danach hatte sich genügend Myzel für weitere Versuche im Medium gebildet.

3.10.2 Extraktion von Pilzkulturen auf Fest-Medium

Um in ausreichender Menge Extrakt zu erhalten, wurden pro Pilzstamm ca. 15 Petrischalen mit Biomalzmedium und zwei Gläser mit Dinkel-Gerste-Medium mit einer Flüssigkultur des Pilzes (Kap. 3.10.1) angeimpft. Diese wurden in Milbenfallen (Wasserwannen mit umgedrehten Glaspetrischalen) bei RT bis zum vollständigen Bewachsen der Petrischalen bzw. DiGe-Gläsern kultiviert. Während die Petrischalen für die Extraktion für mindestens 24 h bei -70 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet werden mussten, konnten die DiGe-Gläser direkt nach Beendigung der Kultivierung extrahiert werden. Für die Gefriertrocknung, oder auch Lyophilisation genannt, wurde durch Anlegen eines Vakuums das in den Kulturen enthaltene gefrorene Wasser sublimiert. Das hat den Vorteil, dass die Pilzkulturen auf schonende Weise getrocknet und damit die am Ende des Wachstums gebildeten Sekundärstoffe nicht verändert werden. Zudem wird so das Wasser aus den Kulturen entfernt, was die Extraktion mit Ethylacetat erleichtert. Um die produzierten Pilzmetabolite zu erhalten, wurde das frische (DiGe-Kultur) bzw. getrocknete (Biomalzagarkultur) Pilzmaterial in einem Mixer zerkleinert und in einen Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend wurden die Pilzstücke mit in 1% NaHCO₃ ausgeschütteltem Ethylacetat überschichtet und für eine Stunde bei 120 rpm und 20 °C geschüttelt. Der Kolben wurde über Nacht stehen gelassen und der Überstand am folgenden Tag über einen Faltenfilter in einen Rundkolben filtriert. Das zurückgebliebene Pilzmaterial wurde erneut mit dem EtAc überdeckt und für eine halbe Stunde bei 120 rpm und 20 °C geschüttelt. Danach wurde der gesamte Inhalt des Kolbens durch den Filter gegeben und das Ethylacetat-Gemisch im Rundkolben gesammelt. Um den reinen Extrakt der Kultur zu erhalten, musste das Ethylacetat wieder entfernt werden. Dies erfolgte mit einem Rotationsverdampfer, bei dem das Ethylacetat in einem Auffangkolben zurückgewonnen wurde. Dazu wurde der Rundkolben mit dem herausgelösten Extrakt an die Anlage befestigt und durch ein Wasserbad auf 45 °C erwärmt und dabei mit 90 rpm gedreht. Durch Anlegen eines Vakuums von etwa 380 mbar konnte der Extrakt eingeengt und vom Lösungsmittel getrennt werden. Der Extrakt wurde zum vollständigen Abdampfen des

Lösungsmittels über Nacht offen stehen gelassen. Der eingetrocknete Extrakt wurde dann mit Methanol-Aceton (1:1) aufgenommen und in ein 10 ml Gläschen mit Schraubdeckel überführt. Nach erneutem Abdampfen des Lösungsmittels in dem Gläschen wurde, zum Entfernen eventueller Fette, der Extrakt mit 1 mL Petroleumether gespült und erneut zum Abdampfen von Lösungsmittelresten offen stehen gelassen. Durch vorheriges Bestimmen des Leergewichts des Gläschens, wurden der Pilzextrakte mit Methanol-Aceton (1:1) auf eine Endkonzentration von 40 mg/ml eingestellt (u.a. Krohn et al., 1992a, 1995, 2004, 2007, Schulz et al., 2008).

3.11 Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie ist ein sehr verbreitetes Verfahren zur Auftrennung und Darstellung von Stoffgemischen. Die Grundlage für die Separation der Stoffe ist deren unterschiedliche Verteilung zwischen der stationären Phase und der mobilen Phase. Die stationäre Phase ist in diesem Fall eine auf einer Aluminiumplatte aufgetragene dünne Kieselgelschicht (TLC Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck) an der die aufpipettierten Substanzen mit Hilfe der mobilen Phase (hier 4% MeOH in Dichlormethan) entlang geführt werden. Dabei verbleiben die einzelnen Stoffe unterschiedlich lang, aufgrund ihrer Löslichkeit in der mobilen Phase und/oder der Wechselwirkung mit der stationären Phase, am Kieselgel. Zur Analyse der in den Extrakten enthaltenen Metabolite, wurden 9 µL des Extraktes 1 cm von unteren Rand der Kieselgelplatte punktförmig aufgetragen. Dabei befand sich die DC-Platte auf einer ca. 40 °C warmen Wärmeplatte, um ein schnelleres Verflüchtigen des Lösungsmittels zu ermöglichen. Da die auf den DC-Platten aufgetragenen Extrakte zwei unterschiedlichen Analysemethoden unterzogen werden sollten, wurden jeweils zwei DC-Platten mit demselben Extrakt-schema angefertigt. Anschließend kamen die DC-Platten in eine mit dem Lösungsmittel (4% MeOH in Dichlormethan) gesättigte gut verschlossene Kammer. Dabei war der Boden bis auf eine Höhe von ca. 1 cm mit dem Laufmittel bedeckt, sodass die DC-Platte in die mobile Phase eintauchte. Nachdem das Lösungsmittel etwa die Hälfte der DC-Platte erreicht hatte, wurde diese aus der Kammer entnommen und ein paar Minuten zum Trocknen danebengelegt und anschließend wieder in die Kammer gestellt. Wenn das Laufmittel 1 cm unter dem Rand der DC-Platte erreicht hatte, wurde sie wieder aus der Kammer entfernt und erneut zum Trocknen unter dem Abzug aufbewahrt. In

Abhängigkeit von der Absorption der einzelnen Komponenten an der stationären Phase und der Affinität zur mobilen Phase sind die Substanzen unterschiedlich weit transportiert worden. Um die entstandenen Banden der Substanzen qualitativ auszuwerten, kann man den Rf-Wert (Retentionsfaktor), ein Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz, ermitteln. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten der Laufstrecke der Substanz (Strecke zwischen Startlinie und Substanzfleck) und der Laufstrecke des Laufmittels (Strecke zwischen Startlinie und Laufmittelfront).

3.11.1 Auswertung der Substanzen mit UV-Licht-Detektion

Nachdem sich die Substanzen während der Chromatographie getrennt hatten, wurden sie wie unter Punkt 3.11 erwähnt, auf zwei unterschiedliche Weisen analysiert. Die eine Platte wurde unter UV-Licht mit den Wellenlängen 366 nm und 254 nm ausgewertet. Dabei können alle ungesättigten organischen Substanzen sichtbar gemacht werden. Alle Banden die bei 366 nm sichtbar werden, wurden mit einem schwarzen Stift markiert und die Banden, welche bei 254 nm zu sehen sind mit einem grünem oder roten Stift. Da viele organische Substanzen eine Eigenfluoreszenz besitzen, werden sie durch die Bestrahlung mit der Wellenlänge von 366 nm angeregt und emittieren ein farbig leuchtendes Licht. Anders ist es bei 254 nm Wellenlänge, bei der das UV-Licht durch den in der Kieselgelschicht enthaltenen Fluoreszenzindikator (mit Mangan aktiviertes Zinksilikat) absorbiert wird. Dabei wird ein grünliches Licht sichtbar und die Substanzen, welche diese Wellenlänge absorbieren, können als dunkler Fleck detektiert werden.

3.11.2 Auswertung der Substanzen durch Verkohlung

Um die Substanzen sichtbar zu machen, welche nicht mit UV-Licht nachweisbar waren, wurde die zweite identisch behandelte DC-Platte mit einem oxidierenden Reagenz, 5% H₂SO₄ in Ethanol gleichmäßig besprüht und danach für 10-15 min bei 110 °C verkohlt (Erb und Böhle, 2009). Durch die dadurch ablaufenden Farbreaktionen lassen sich Banden mit Substanzen erkennen, die z.B. zur Stoffgruppe der Zucker und Lipide gehören (Potthast und Hamm, 1973).

3.12 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie, kurz GC-MS, ist ein Verfahren, um unbekannte Stoffgemische aufzutrennen, zu identifizieren und teilweise auch zu quantifizieren. In diesem System sind die beiden oben genannten Verfahren miteinander verbunden. Im ersten Schritt wird das Stoffgemisch in der GC aufgetrennt. Hierfür werden sie durch graduelles Erhitzen in die Gasphase überführt. Die Proben werden zunächst durch einen 220°C heißen Glaswollefiter eingespritzt. Damit sie allerdings nicht schon an dieser Stelle verkohlen, müssen sie zuvor methyliert werden. Der Hauptteil der GC besteht aus einer Trennsäule, einer bis zu 100 m langen Glaskapillare, die aus einer stationären sowie einer mobilen Phase besteht. In der Kapillare wird die aufgetragene Probe mit Hilfe der mobilen Phase, einem Inertgas, welches sehr reaktionsträge ist, befördert. Die Wände der Säule sind mit einer definierten stationären Phase ausgekleidet und ermöglichen es den einzelnen Substanzen in der Probe, aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften, unterschiedlich starke Wechselwirkungen einzugehen. Am Ende der Säule misst ein Detektor den Austrittszeitpunkt der einzelnen Substanzen, welcher sich aus der unterschiedlichen Verweildauer der Stoffe an der stationären Phase ergibt. Von der GC werden die gasförmigen Substanzen nun in die verbundene MS weitergeleitet, wo sie ionisiert werden. Die entstandenen ionisierten Moleküle gelangen durch zwei verschiedenartig lange Röhren, sogenannte Quads. Dabei erfolgt eine grobe Vorsortierung durch ein Pre-Quad und eine feinere Selektion durch ein weitaus längeres analytisches Quad. Die in den Quads vorliegenden Magnetfelder beeinflussen das Flugverhalten der Moleküle dahingehend, dass nur Ionen einer zuvor festgelegten Molekülmasse gerade fliegen, hingegen die anderen Ionen so abgelenkt werden, dass sie gegen die Wände fliegen. Einzig Ionen mit definiertem Molekulargewicht sind in der Lage die Quads zu durchqueren und am Ende gegen einen Phosphatschirm zu stoßen. Die dabei messbaren Blitze dienen der Bestimmung und auch Quantifizierung der Substanzen. Diese Vorgehensweise wird, für alle eingestellten Molekulargewichte und mit allen aus der GC in die MS überführte Stoffe, wiederholt.

Diese Methode zur Auftrennung und Analyse von Stoffen wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um aus Mono- und Dualkulturen (Kap. 3.19) von Pilzen gewonnene Extrakte (Kap. 3.10) auf darin enthaltene interessante Substanzen zu untersuchen. Als Kontrolle diente das verwendete Medium. Die Probenanalyse fand durch die AG

Dickschat am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig, sowie der AG Ebel an der Universität Aberdeen in Schottland statt.

3.13 CLSA-Analyse flüchtiger Substanzen

CLSA steht für Closed-Loop-Stripping-Apparatus (Abb. 3.1) und ist ein Verfahren flüchtige Substanzen, abgegeben von zum Beispiel einer sich im Wachstum befindenden Pilzagarkultur, aufzufangen und mittels gekoppelter GC-MS zu analysieren.

Die zu untersuchende Probe wird in das dicht verschlossene System (Abb. 3.1) eingeführt und darin für 24h stehen gelassen. Während dieser Zeit zirkulieren die von der Probe abgegebenen flüchtigen Stoffe in einem immer währenden Luftstrom (z.B. inertes Gas), wobei sie durch einen Aktivkohlefilter gelangen, um dort

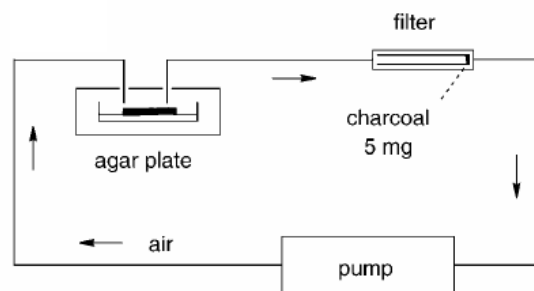


Abbildung 3.1: Aufbau CLSA, Quelle: Dickschat et al., 2005.

gebunden zu werden. Während dieses Prozesses wird die Probe weder beschädigt noch kontaminiert und kann somit über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Die im Filter gebundenen Substanzen können dann eluiert und analysiert werden (Dickschat et al., 2005, Lorbeer et al., 1984). Diese Methode wurden in Zusammenarbeit von der AG Dickschat am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt.

3.14 Eschenschnellanzucht

Modifiziert nach Raquin et al. (2002), gibt es eine Methode, bei der es möglich ist, Eschensamen innerhalb weniger Tage zum Keimen zu bringen. Hierfür mussten die Samen zunächst für 24 h in Wasser quellen gelassen werden, um anschließend das Perikarp zu entfernen. Im Anschluss wurden die Samen in 0,3 M NaOH für 20 min eingeweicht und über Nacht (15 h) in 0,2% $\text{Ca}(\text{ClO}_2)_2$ -Lösung bei 4 °C rehydriert und sterilisiert. In einem zweiten Sterilisationsschritt wurden die Samen für 2 h in 2% $\text{Ca}(\text{ClO}_2)_2$ -Lösung bei RT aufbewahrt und danach auf einem sterilen Filterpapier etwas trocknen gelassen (Abb. 3.2). Mit Hilfe eines Skalpellts wurden vorsichtig die Samenspitzen entfernt und die gekappten Samen auf H_0 -Medium (Kap. 3.1) gelegt.

Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Eschensamen auf H₁₀-Medium (Kap. 3.1) umgesetzt und unter gleichen Bedingungen bis zum Auskeimen von Wurzeln und Blättern in Petrischalen kultiviert.

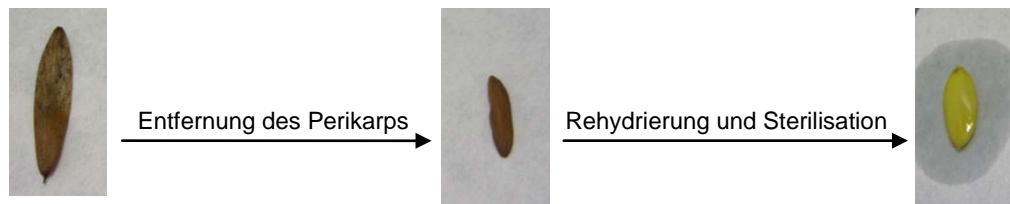


Abbildung 3.2: Darstellung der Eschensamen in verschiedenen Sterilisationsschritten. Links: Einzelner Eschensamen von *Fraxinus excelsior*; Mitte: Eschensame ohne Perikarp; Rechts: Rehydrierter und oberflächensterilisierter (gebleichter) Eschensame. Fotos C. Junker

3.15 *In Vitro* Virulenz-Tests

In vitro Versuche haben den Zweck, möglichst einfach und in kürzester Zeit Aussagen über die Eigenschaften und das Verhalten eines Stoffes, Reagenz oder Organismus zu treffen. Diese Voruntersuchungen lassen Aufschluss über eventuell ähnliche oder gleiche Reaktionen zu, wie sie *in vivo* stattfinden würden. Zudem lassen sich auf diese Weise Tests etablieren, welche mit den *in vivo* erbrachten Ergebnissen korrelieren und diese zeit- und kostenaufwändigeren Versuche zum Teil ersetzen. Um die morphologisch verschiedenen Pilzstämme von *H. p.* auch in Bezug auf ihre potentiell unterschiedliche Virulenz hin zu charakterisieren, wurden sie verschiedenen, zum Teil seit Jahren im Labor durchgeführten Bio-Schnelltests, unterzogen (Krohn et al., 1992b, Schulz et al., 2008). Die verwendeten Testorganismen waren *Chlorella fusca* (Grünalge) und *Agrostis stolonifera* (Weißes Straußgras), sowie Blätter und Sämlinge von *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche). Dafür wurden zum einen die aus einigen Stämmen gewonnen Extrakte verwendet (Kap. 3.8), aber auch Myzel von mit *H. p.* kultivierten Festmedien (Kap. 3.3). Ergänzt und zum Teil ersetzt beziehungsweise verändert wurden diese Schnelltests durch Versuche mit *Ocimum basilicum* (Basilikum).

3.15.1 Agardiffusionsassay mit *Chlorella fusca*

Die einzellige Grünalge *Chlorella fusca* stellt einen einfach zu handhabenden Organismus dar, welcher gut geeignet ist, um Aussagen über die Algizität von pilzlichen Sekundärmetaboliten, enthalten in den Pilzkulturextrakten (Kap. 3.8), zu treffen. Nun waren zwar nicht algizide Eigenschaften von *H. p.*- Extrakten

Gegenstand der Untersuchungen, dennoch sollte überprüft werden, ob dieser Organismus einen guten Indikator für die potentiell unterschiedliche Virulenz der Stämme darstellt. Zu diesem Zweck wurden auf CP-Agarplatten (Kap. 3.1) jeweils zwei Antibiotika-Testblättchen (Macherey-Nagel, d = 9 mm) in einem Abstand von ca. 5 cm gelegt und darauf 50 µL des Extrakts gegeben. Nachdem der Extrakt in den Agar diffundiert ist, wurden die CP-Platten mit einer steril beimpften wässrigen Suspension von *C. fusca* besprüht und für eine Woche bei 20 °C und 8 h Licht (800 x 10 Lux) kultiviert. Die um das Testblättchen entstandenen Hemmhöfe wurden von der Mitte des Blättchens ausgehend bis zum Rand des Hemmhofes vermessen.

3.15.2 Keimungstest mit *Agrostis stolonifera*

Ähnlich wie bei dem Test mit *C. fusca* verhält es sich mit dem Gras *Agrostis stolonifera*. Auch hier galt der Test nicht vorwiegend der herbiziden Wirkung der Extrakte, sondern er sollte ein Äquivalent zu den Versuchen an Eschensämlingen darstellen. Bei dem Test sollte untersucht werden, inwieweit die Pilzextrakte das Auskeimen der Samen hemmen oder nicht. Dazu wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Greiner) pro Well 30 Samen mit 250 µL Gamborg's B5-Lösung (Sigma) gegeben und von dem zu untersuchenden Extrakt jeweils 9 µL dazu pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde in einer Feuchtkammer inkubiert und nach etwa zwei Wochen ausgewertet.

3.15.3 Blattsegmenttest von *Fraxinus excelsior*

Der Blattsegmenttest (Yarwood, 1946) ist eine bereits seit Jahren angewandte Methode bei der Untersuchung der Wirt-Pathogen-Beziehung (Björkman, 1960, Osman-Ghani, 1982, Felsenstein et al., 1998, Chin et al., 2001). Es stellt eine günstige, einfache und zeitsparende Methode dar, um die Pathogenität der Stämme gegenüber ihren Wirt zu testen. Es wurden Blätter von der Gemeinen Esche (Standort Mittelriede, Braunschweig) gesammelt und unter fließendem Leitungswasser gereinigt. Anschließend wurden sie abgetrocknet und in Glaspetrishalen mit feuchtem Filterpapier gelegt. Auf die Blätter wurden 25 µL des Extrakts gegeben und bei 20 °C und Licht für eine Woche inkubiert. Das Maß der Schädigung auf den Blättern wurde in Form bräunlicher Verfärbungen sichtbar

3.15.4 Auskeimtest mit Pilzkulturextrakten

Wie in Kapitel 3.14 beschrieben werden die Eschensämlinge nach einem verkürzten Verfahren angezogen. Diese Methode sollte nun dazu verwendet werden, Eschensämlinge auf ihre Keimfähigkeit hin zu untersuchen, wenn dem Kultivierungsmedium Pilzkulturextrakt (Kap 3.10) von *H. p.* zugesetzt wird. Diese Extrakte können Sekundärmetabolite enthalten, zu denen unter anderem Virulenzfaktoren gehören, welche die Eschensamen an der Auskeimung hindern. Diese Methode soll zeigen, ob auch durch den Kulturextrakt im Vorfeld auf die unterschiedliche Pathogenität der verschiedenen Stämme rückgeschlossen werden kann. Dazu wurde in gewohnter Weise H₁₀-Agar hergestellt und Petrischalen gegossen. Im noch flüssigen Zustand wurde dem Medium in den Platten der Pilzkulturextrakt (Endkonzentration im Medium 2 µg/L) zugegeben und zur besseren Verteilung leicht geschwenkt. Nach dem Erstarren des Mediums wurden pro Petrischale 8 vorbehandelte Eschensamen (Kap. 3.14) ausgelegt und 2 Wochen bei 8 h Licht bei 20 °C kultiviert. Als Kontrolle dienten Samen ausgelegt auf Petrischalen mit H₁₀-Medium versetzt mit der gleichen Menge puren Lösungsmittels EtOH_{abs.} bzw. unverändertem H₁₀-Medium.

3.15.5 Infektion axenischer Eschensämlinge

Anders als bei den ersten axenischen Infektionsversuchen mit Eschensämlingen, welche im Reagenzglas durchgeführt wurden, kamen die Sämlinge für die hier



Abbildung 3.3:
2 Monat alter
Eschensämling
inokuliert mit
Myzel von *H. p.*
Foto C. Junker

beschriebenen Infektionen in größere Kulturgläschen (H~9 cm, Ø~6 cm) mit Plastikdeckel und jeweils 50 ml H₁₀ -Medium (Kap. 3.1). Diese Gefäße boten den Pflanzen nicht nur mehr Platz und somit eine altersgerechte, stressärmere Entwicklung, sondern ermöglichten auch unterschiedliche Arten der Infektion.

Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde ein kleines Impfstück (5x5 mm) von einer auf Agarmedium kultivierten Pilzkolonie oder einer Flüssigkultur, neben die Eschensämlinge in das Kulturgläschen (Abb. 3.3) gebracht. Auf diese Weise sollte die Kontaminationsrate, durch die sonst verwendete Impföse, so

gering wie möglich gehalten werden. Die Auswertung erfolgte nach sechs Wochen.

3.15.6 Alternative Infektion mit Basilikumsämlingen

Trotz eines verkürzten Verfahrens zur Anzucht junger Eschen (Kap. 3.14), erweisen sich die Studien zur Virulenz von *H. p.* an Eschensämlingen als zeitintensiv. Zudem müssen für statistisch relevante Aussagen eine große Zahl an Pflanzen mehrfach untersucht werden, was wiederum eine große Zahl an Kulturgläsern, welche zur gleichen Zeit benötigt werden, nach sich zieht. Das reduziert wesentlich die mögliche Anzahl der zu untersuchenden Stämme auf eine bisher nur kleine Auswahl. Zudem beanspruchen diese Gläser mehr Platz, als die zuvor verwendeten Reagenzgläser. Auf gleicher Fläche und mit geringerem Materialaufwand wurde nach einem geeigneten und möglichst gleichwertigen Organismus gesucht, welcher die untersuchte unterschiedliche Pathogenität der Stämme widerspiegelt. Die Wahl fiel auf *Ocimum basilicum*, dem Basilikum. Er gehört zur Familie der Lamiaceae und steht gemeinsam mit der Familie der Oleaceae, zu der die Gemeine Esche gehört, in der Ordnung der Lamiales (Bresinsky et al., 2008). Aufgrund dieser nahen Verwandtschaft und der wesentlich einfacheren Handhabung der Sämlinge, wurden mit ihnen, parallel zu den Infektionsversuchen an Eschensämlingen, Virulenzstudien durchgeführt. Damit konnte ein neuer Schnelltest etabliert und eingeführt werden.

3.15.6.1 Anzucht Basilikumsämlinge

Basilikumsamen der Sorte Genoveser (Mayer's Saatgutsortiment) wurden in 70 %igem Ethanol, 3 %igem Natriumhypochlorid und Wasser nach folgendem Schema oberflächensterilisiert:

70% EtOH 3 sec.

3% NaOCl 30 sec.

H₂O_{steril} 3 x 3 min.

Nach der Sterilisation wurden die Samen auf Biomalzagar in Petrischalen ausgelegt und bei 20 °C und 8 h Licht auskeimen gelassen. Nach ca. 4 Tagen zeigten die Keimlinge erste Blätter und eine Wurzel.

3.15.6.2 Auskeimtest Basilikumsämlinge

Jeweils 10 Basilikumsamen wurden nach der Oberflächensterilisation (Kap. 3.15.6.1) auf Biomalzmedium in Petrischalen ausgelegt, welches analog zu Kap. 3.15.4 pro

Platte 300 μ L des Extrakts (40 mg/mL) zugesetzt wurde. Die Auswertung erfolgte nach einer Kultivierung von 15 Tage bei 20 °C und 8 h Licht.

3.15.6.3 Infektion Basilikumsämlinge

Auf eine Biomalzplatte wurden 10 Pflanzen verteilt und mit drei Impfstücken von einer Pilzagarkultur von *H. p.* beimpft. Pro Pilzstamm und Durchgang wurden zwei Platten mit insgesamt 20 Pflanzen angeimpft. Diese wurden in Milbenfallen bei 8 h Licht und 20 °C kultiviert und nach einer Inkubationszeit von 6 Wochen ausgewertet.

3.16 Infektion junger Eschen im Gewächshaus

Um Eschenpflanzen auch unter naturnahen Bedingungen untersuchen zu können, wurden im Herbst 2010 zahlreiche Eschensämlinge, welche durch das beschriebene Schnellverfahren angezogen wurden (Kap. 3.14), zunächst zu mehreren in Anzuchterde in Pflanzschalen (Abb. 3.4-3.6) und später vereinzelt in Töpfe (Abb. 3.6) gepflanzt. Durch freundliche Unterstützung und in Kooperation mit dem Julius-Kühn-Institut Braunschweig (Prof. Wulff, Herr Langer) wurden die Sämlinge eingetopft und in einem eigens zur Verfügung gestellten kleinen Gewächshaus mit natürlichen Lichtbedingungen und durchschnittlicher Temperatur von 16 °C angezogen.



Abbildung 3.4: Eschensämlinge, 2 Wochen alt in Pflanzkulturschalen in einem Gewächshaus des JKI, Braunschweig. Foto C. Junker



Abbildung 3.5: Eschensämlinge, 4 Wochen alt in Pflanzkulturschalen in einem Gewächshaus des JKI, Braunschweig. Foto C. Junker



Abbildung 3.6: Eschensämlinge, 12 Wochen alt in Einzeltöpfen in einem Gewächshaus des JKI, Braunschweig. Foto C. Junker

In ähnlicher Weise zu den Infektionen unter axenischen Bedingungen (Kap. 3.15.5), wurden die Pflanzen im Gewächshaus mit Myzel von verschiedenen Stämmen von *H. p.* infiziert. Allerdings wurden die Zahnstocher mit dem anhaftenden Myzel vorsichtig in das untere Drittel des Spross gesteckt und nicht wie im Kulturgläschen neben die Pflanze, um zu gewährleisten, dass der Pilz die Pflanze infiziert. Den Kontrollpflanzen wurde der Zahnstocher ohne Myzel in den Spross gesteckt. Die Infektionen wurden nach 1 Monat ausgewertet.

3.17 Bonitur der Infektionsversuche

Die Bonitur aller Infektionsversuche geschah zum einen durch optische Auswertung der Blätter auf das Vorhandensein von Chlorosen und Nekrosen und zum Anderen durch das Erheben von Messdaten zu denen die Länge der Wurzel, des Spross, die Anzahl der Blätter, sowie die Bestimmung des Trockengewichts einzelner Pflanzenteile oder der gesamten Pflanze gehörten. Zudem wurden nach jeder Infektion pro inokulierten Stamm Pflanzen erneut oberflächensterilisiert (wie bei Kap. 3.15.6.1) und die Pflanze unterteilt in Blätter, Spross und Wurzeln in kleingeschnittenen Fragmenten auf KM-Agar ausgelegt, um festzustellen, aus welchen Teilen der Pflanze der inokulierte Pilz reisolierbar ist.

3.18 Mikroskopie

Eine weitere Möglichkeit, Pilze in Pflanzen nachzuweisen, stellen verschiedene Möglichkeiten der Mikroskopie dar. Zu ihr gehören unter anderem die einfache Lichtmikroskopie und die hochauflösende Rasterelektronenmikroskopie.

3.18.1 Lichtmikroskopie

Für die lichtmikroskopischen Aufnahmen (Axioskop, Zeiss) wurde der zu betrachtende Pflanzenabschnitt mittels eines Handmikrotoms in möglichst dünne Scheiben geschnitten. Eine andere Möglichkeit bestand darin, die Pflanzenteile in einer AFE-Fixierlösung (Kap. 3.1) zu fixieren, um sie anschließend nach einem Verfahren von Heraeus und Kulzer (Technovit) in einem kaltpolymersierenden Kunststoff (Technovit 7100, Technovit 3040) einzubetten und davon mit Hilfe eines Grundschlittenmikrotoms (Leica, Wetzlar) definierte Dünnschnitte anzufertigen. Alle

angefertigten Schnitte mussten zur Kontraststeigerung mit Trypanblau (Kap. 3.1), welches vorwiegend pilzliche Strukturen sichtbar macht, angefärbt werden.

3.18.2 Rasterelektronenmikroskopie

In Kooperation mit dem Institut für Materialwissenschaften (AG Prof. Joachim Rösler) an der TU Braunschweig, bot sich die Möglichkeit rasterelektronische Aufnahmen vom Teleomorph *Hymenoscyphus pseudoalbidus* zu machen. Mit dem Rasterelektronenmikroskop ist es möglich, dreidimensionale Aufnahmen in extrem starker Vergrößerung (bis zu 500.000) zu machen. Dabei wird das zu mikroskopierende leitfähig gemachte Objekt, welches sich im Gerät in einem Vakuum befindet, mit einem Elektronenstrahl beschossen. Dieser Strahl rastert dann die Oberfläche des Objekts ab und die dabei auftretenden Wechselwirkungen mit der Objektoberfläche dienen zur Berechnung des Schwarz-Weiß Bildes. Die so abgebildeten Oberflächen stellen sich nicht nur sehr plastisch dar, sondern weisen zudem eine hohe Tiefenschärfe auf.

Für die Aufnahmen wurden die Proben wie folgt vorbereitet:

- Fixieren der Proben für mindestens 24 h in AFE-Fixierlösung (Kap. 3.1)
- Entwässerung der Proben:
 - Acetonreihe

50%	15 min.
70%	15 min.
90%	15 min.
100%	15 min.
 - Ethanol

100%	30 min.
100%	30 min.
- HDMS-Ethanol_{abs}

(1:1)	10 min.
-------	---------
- HDMS

100%	5 min.
100%	5 min.
100%	5 min.



Abbildung 3.7:
Metallträger mit auf
Kohleplättchen fixierten
Pflanzenmaterial.
Foto C. Junker

Nach kurzem Trocknen der Proben auf Filterpapier wurden sie auf Kohleplättchen (Leit-Tabs von Plano) geklebt, welche sich bereits vorbereitet auf einen kleinen Metallträger befanden. Der so mit den Proben präparierte Metallträger (Abb. 3.7) kam bis

zur weiteren Probenbearbeitung in ein mit Silicagel gefüllten Exsikkator. Um die Proben leitfähig zu machen, wurden sie vor dem Einschleusen in das REM (LEO 1550, LEO) noch mit Gold besputtert (Sputter sb 5000, Sputterzeit 4 min.).

3.19 Dualkulturen von Endophyten und *H. pseudoalbidus*

Dualkulturen sind eine gute Möglichkeit, den Einfluss zweier verschiedenartiger, in diesem Fall Pilze, aufeinander zu untersuchen. Dabei kommt es unter Umständen zur Hemmung oder Stimulierung des Wachstums der Pilze. Verursacht wird dies, durch die Co-Kultivierung initiiert und ins Medium abgegebene(n) Substanz(en), die dem Pilz zur Abwehr gegen zum Beispiel andere Pilze dient.

Die Dualkulturen wurden wie im Schema (Abb.3.8) dargestellt angelegt. Der Abstand zwischen den Myzelstücken, überimpft aus einer Agar-Kultur, betrug immer 5 cm. Als Kontrolle wurden vom Endophyten und dem *H. p.*-Isolat Monokulturen angeimpft. Sie wurden 20 Tage im Dunkeln bei 20 °C kultiviert. Zur Auswertung wurde der Durchmesser der einzelnen Kolonien in unterschiedliche Richtungen bestimmt, einmal waagerecht (D_W) und einmal senkrecht (D_S) zum Dualkulturpartner, um daraus den Radius (R) der Kolonie zu bestimmen.

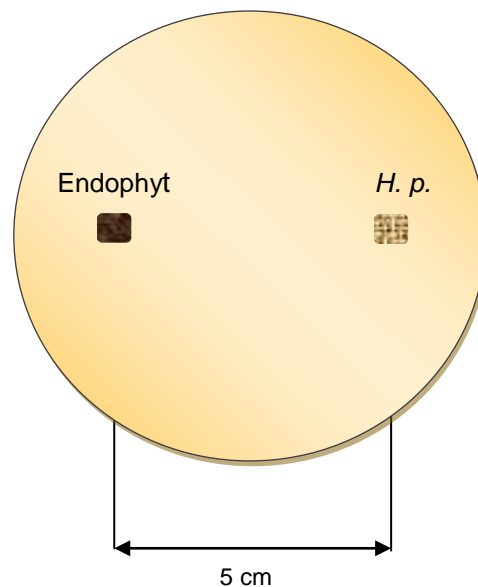


Abbildung 3.8: Dualkulturschema, links Myzelstück des Endophyten, rechts Myzelstück von *H. pseudoalbidus* mit einem Abstand von 5 cm. Der Durchmesser der Petrischale entspricht 9 cm.

Der Radius der Pilzkolonie wurde aus den beiden ermittelten Durchmessern nach folgender Formel berechnet (Peters et al., 1998):

$$\text{für } D_W \leq 4 \text{ cm: } R = \frac{D_W + D_S}{4}$$

$$\text{für } D_W > 4 \text{ cm : } R = \frac{(D_W - 2) + D_S}{3}$$

Da der Durchmesser D_K ab $D_K \geq 4$ cm nur noch zur Plattenmitte hin zunehmen kann, da das Wachstum des Pilzes in Richtung des Petrischalenrand begrenzt wird, ist in diesen Formeln berücksichtigt. Die berechneten Radien eines Ansatzes wurden zu einem mittleren Radius R_M zusammengefasst.

3.20 Hemmtest gegen Fruchtkörper von *H. pseudoalbidus*

Fruchtkörper von *H. p.* werden auf abgefallenen Blattstielen von Eschen gebildet und sind für die Verbreitung der Ascosporen verantwortlich, welche ungefähr zwischen Mai und Oktober Esche infizieren und das beschriebene Krankheitsbild verursachen (Kap. 2.2). Um deren Verbreitung zu verhindern, und damit eine mögliche Eindämmung der Infektion zu erreichen, wurden Behandlungen dieser Fruchtkörper mit den Fungiziden Mirage®45EC (45% w/v Prochloraz ; Makhteshim Agan Industries, Israel) und Prosper®500EC (50% w/v Spiroxamine ; Bayer CropScience), mit Pilzkulturextrakten der Stämme 9938, 9939, 9942 und mit Kalkstickstoff (MANNA, Wilhelm Haug GmbH & Co. KG) unternommen. Die Blattstiele wurden im Elm (52° 12' 03" N 10° 43' 07" E; 52° 12' 11" N 10° 43' 08" E; 52° 11' 59" N 10° 43' 19" E), einem Gebiet mit stark erkrankten Eschen, gesammelt und im Labor auf feuchten Filterpapier unter transparenter Folie abgedeckt bei 20 °C und 8 h Licht (800 x 10 Lux) kultiviert. Für die Behandlung mit den Fungiziden wurden diese 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und die Blattstiele mit den Fruchtkörper damit übersprüht (~70 mL/m²). Die Pilzkulturextrakte wurden auf eine Konzentration von 40mg/ml eingestellt und ebenfalls als Sprühsuspension über die Fruchtkörper verteilt (2.8 g/m²). Als Lösungsmittel diente hier MeOH/Ac (1:1). Kalkstickstoff ist ein fester Stoff und musste aufgrund der groben Körnung zunächst im Mörser fein zerrieben werden

bevor er mittels eines Siebes ebenfalls über die Blattstiele gleichmäßig verteilt werden konnte (10 g/m^2). Als Kontrolle im Falle der Extrakte diente das Lösungsmittel MeOH/Ac, ansonsten blieben die Kontroll-Blattstiele für die anderen Substanzen unbehandelt. Nach sieben tägiger Einwirkzeit wurden die Fruchtkörper auf Vitalität, Nekrosen, Sporenabschuss und eventuell neu entwickelte Fruchtkörper hin ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Pilz-Isolate aus der Esche

Um nachzuweisen, ob auch Eschenbäume aus der Region bereits mit *Hymenoscyphus pseudoalbidus* infiziert sind, wurde nekrotisiertes Gewebe von Zweigen auf Agarmedium ausgelegt (Kap. 3.4). Daraus wurden 23 verschiedene Isolate von *H. pseudoalbidus* isoliert. Sie wurden mit dem Kürzel EL für Elm (Tab. 3.1), dem Standort der Bäume, versehen. Bei der Isolierung wurden auch Pilze aus anderen Gattungen, wie *Pleurocytophora*, *Phomopsis*, *Cryptosporiopsis*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Coniothyrium* und *Stagonospora*, isoliert. Sie machten zwar rund 49% der Isolate aus, aber allein die Art *H. pseudoalbidus* wurde zu über 50% nachgewiesen.

4.2 Morphologische Charakteristika der *H. pseudoalbidus* - Isolate

Für die lichtmikroskopischen Bilder wurden Präparate direkt von einer bewachsenen Kultur angefertigt oder zuvor fixiert und Dünnschnitte hergestellt und zur besseren Kontrastierung gefärbt (Kap. 3.18.1). Für Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen (REM) mussten die Präparate nach einem mehrstufigen Trocknungsprozess auf einem Metallträger fixiert und mit leitfähigem Gold besputtert werden (Kap. 3.18.2).

4.2.1 Morphologie und Histologie des Apotheziums

Die Hauptfruchtform von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* bildet auf Eschenblattstielen ca. 2 mm kleine weiß-gelbe Fruchtkörper. Dabei handelt es sich um Apothezien, becherförmige Ascosporenträger, die Feuchtigkeit, Licht und Wärme benötigen, um sich auszubilden. Sie sind während der Sommer- und Herbstmonate unter Eschenbäumen an Blattspindeln vom Vorjahr zu finden (Abb. 4.1 und 4.2).



Abbildung 4.1: Eschenblattstiele aus dem Vorjahr mit Fruchtkörpern (Apothezien) von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, ausgelegt auf feuchtem Filterpapier und kultiviert bei 20 °C und Licht. Foto C. Junker



Abbildung 4.2: Nahaufnahme von Fruchtkörpern (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) auf der Blattspindel einer Esche. Eine Einheit entspricht 1mm. Foto C. Junker

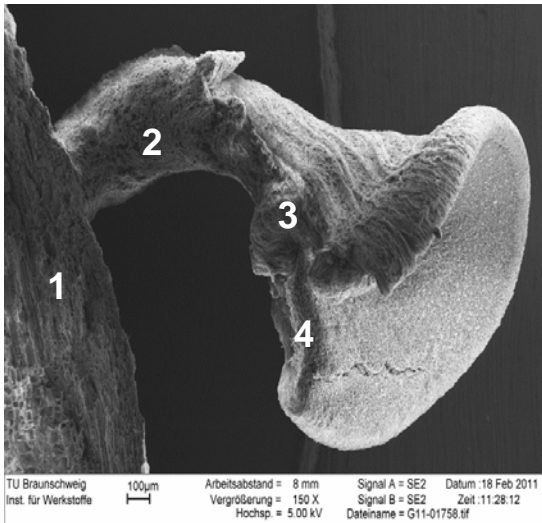


Abbildung 4.3: REM-Aufnahme eines Fruchtkörpers von *H. pseudoalbidus* auf einer Blattspindel von *F. excelsior*. Foto J. de Vries

Ein in Längsrichtung angeschnittener Ascocarp von *Hymenoscyphus* (Abb. 4.3) sitzt auf einer Blattspindel (1) der Esche, auf die er natürlicher Weise zu finden ist. Der ausgereifte Fruchtkörper besteht aus einem 1-1,5 mm langem Stiel (2) auf dem sich das Apothezium (3) befindet und an dessen Oberfläche sich wiederum das Hymenium (4) ausbildet. An der Basis des Ascus wachsen zahlreiche Hyphen im Holz (1) und bilden das Pseudosklerotium, woraus sich der Fruchtkörper entwickelt und durch das

Holz nach außen wachsen konnte. In den Abbildungen 4.4 bis 4.5 wird die detaillierte Morphologie der Asci sichtbar. Auf dem Fruchtkörper (Abb. 4.4), aufgenommen mit einem Stereomikroskop, wurde schemenhaft zum besseren Verständnis nachträglich das Hymenium appliziert. Das Hymenium (4.5), hier ein mit Trypanblau gefärbter Längsschnitt, besteht aus Paraphysen (roter Pfeil) und Asci (blauer Pfeil). Paraphysen sind sterile Ascusschläuche während die dicht beieinander liegenden schlanken Asci die Ascosporen enthalten, welche bei Erreichen der Reife ausgeschleudert werden (Esser, 2000).

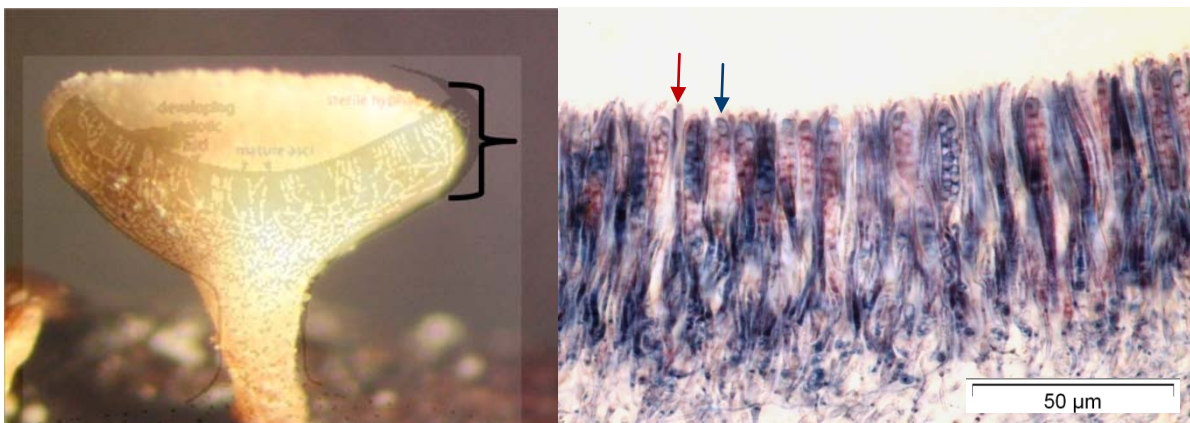


Abbildung 4.4 und 4.5: Links: Ascus von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, aufgenommen unter dem Stereomikroskop bei 7.5x Vergrößerung, nachträglich überlagert wurde die gezeichnete Struktur des Hymeniums. Rechts: Ausschnitt eines Längsschnitts eines mit Trypanblau gefärbten Hymeniums. Fotos C. Eickhorst

Eine einzelne Ascospore ist links in der ungefärbten lichtmikroskopischen Aufnahme als Bild im Bild zu sehen. Sie ist ellipsoid mit einer glatten Oberfläche und misst in der Länge ca. 16,7 μm (Abb. 4.6). Sie ist nach dem verlassen des Ascus von einer eigenen festen Zellwand umgeben und besitzt, wie alle Ascosporen, keine Geißeln. Jeder Ascus kann bis zu 8 Ascosporen (Tochterkerne) produzieren, welche ungleichmäßig zweireihig angeordnet sind und jeweils zwei Kerne enthalten. Die stark kontrastierte Abbildung 4.7 soll die Morphologie Ascus und der Ascusspitze verdeutlichen (Pfeile). Bei den Ascomyceten unterscheidet man je nach der Struktur der Ascuswand und des Öffnungsmechanismus zwischen vier verschiedenen Ascusmorphen. Die Helotiales, zu denen *H. p.* gehört, sind unitunicat und haben inoperculate (ohne Deckel öffnend) Asci mit einem Porus bzw. einer Öffnung für den Sporenaustritt.

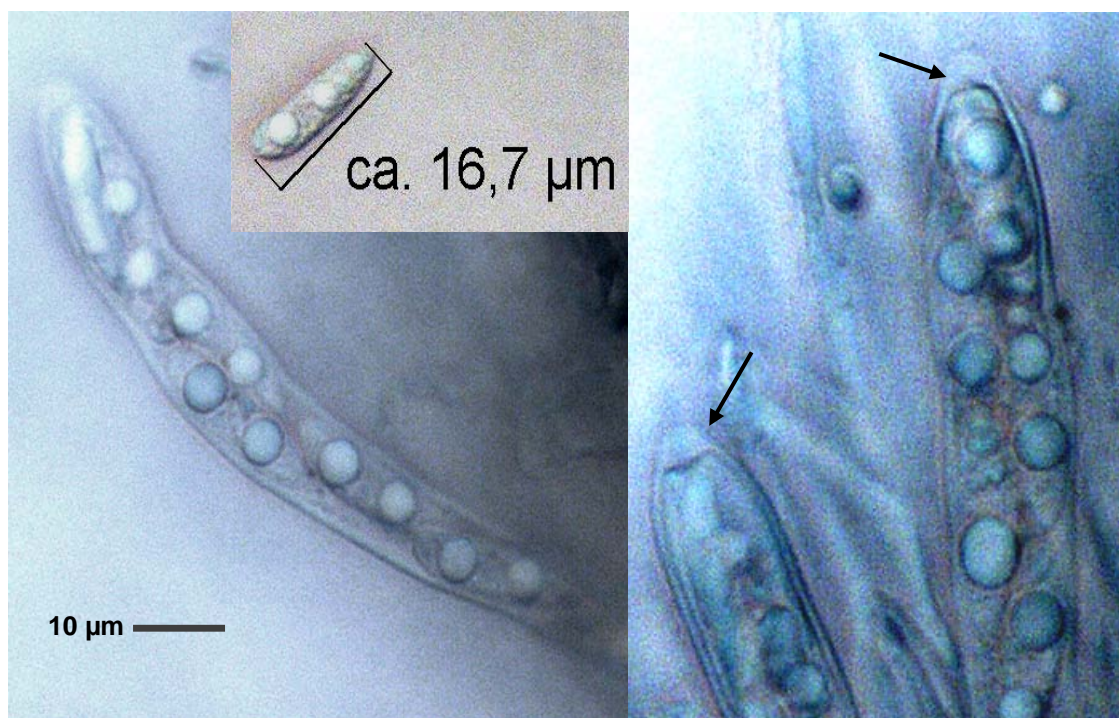


Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7: Links: Einzelner Ascusschlauch mit sechs heranreifenden Ascosporen. Als Bild im Bild ist eine einzelne Ascospore mit einer Größe von ca. 16,7 μm dargestellt. Rechts: Vergrößerte Darstellung zweier inoperculaten Ascusspitzen. Pfeile zeigen auf Öffnung, aus denen die Sporen austreten. Foto J. de Vries

Im REM-Verfahren aufgenommen sind die hier auf Kopf gestellte lange schlauchförmigen Asci zu sehen, welche die Ascosporen (ellipsenförmige Umrandung) enthalten (Abb. 4.8, links). Alle Asci haben eine zylindrisch-keulenförmige Gestalt und sind im ausgereiften Zustand ca. 50 μm lang und 5-6 μm breit. Das Quadrat stellt den in Abbildung 4.9 vergrößerten Ausschnitt der Ascusspitze dar. Dabei ist auch hier zu erkennen, dass der Ascus apikal die für die Helotiales typische inoperculate Öffnung besitzt (Pfeil).

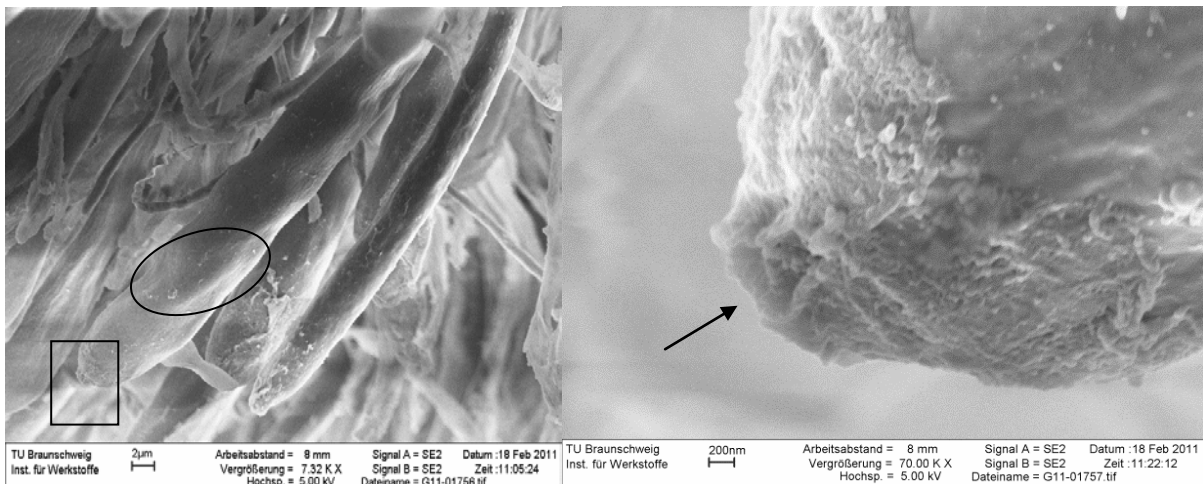


Abbildung 4.8 und 4.9: REM-Detailaufnahmen des Ascus eines Fruchtkörpers von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Abbildung 4.14 (links) zeigt mehrere Asci mit den darin enthaltenen Ascosporen (Ellipse). Abbildung 4.9 (rechts) ist ein vergrößerter Ausschnitt von Abb. 4.8 (Quadrat) und zeigt die Spitze des Ascus mit Öffnung (Pfeil). Fotos J. de Vries

Im Weiteren fanden histologische Untersuchungen der Fruchtkörper auf den Blattspindeln statt, um deren Wachstum in und auf dem natürlichen Substrat zu dokumentieren. Von den in einem speziellen Kunstharz eingebetteten Spindeln mit anhaftenden Asci wurden mit einem Mikrotom ca. 10 μm dünne Schnitte angefertigt und mit Trypanblau kontrastiert (Kap. 3.18.1). Das Plektenchym des lang gestreckten Fruchtkörperstiels besteht aus länglichen Hyphen (Abb. 4.10 u. 4.11 Nr. 1). Die äußere Schicht bildet das Excipulum (Nr. 2), eine ein- bis vielschichtige Rinde kleinzelliger Hyphen. Zudem konzentrieren sich am Fuße des Stiels am Übergang zum Blattstiel viele Hyphen in wenigen Pflanzenzellen. Die Pilzfäden wachsen überwiegend in den äußeren Zellschichten und weniger im Zentrum des Blattstiels. An der Basis des Fruchtkörpers ist eine helle, weniger stark blau gefärbte abgerundete Struktur zu erkennen (Abb. 4.10 u. 4.11, Pfeil). Diese Verdickung von mehreren Pilzhypen könnte ein spätes Stadium des Primordium sein, einer sich unter der Rinde befindlichen Struktur. Aus dieser Vorstufe entwickeln sich die Fruchtkörper.



Abbildung 4.10: Mit Trypanblau gefärbter Fruchtkörper von *Hymenoscyphus* spp. auf einem Eschenblattstiel von *Fraxinus excelsior*. Sichtbar ist der untere Fruchtkörperansatz (blau gefärbt) und ein Teil der Blattstielzellen (ungefärbt). 1: Plektenchym, 2: Excipulum, weißer Pfeil: Primordium. Foto C. Eickhorst

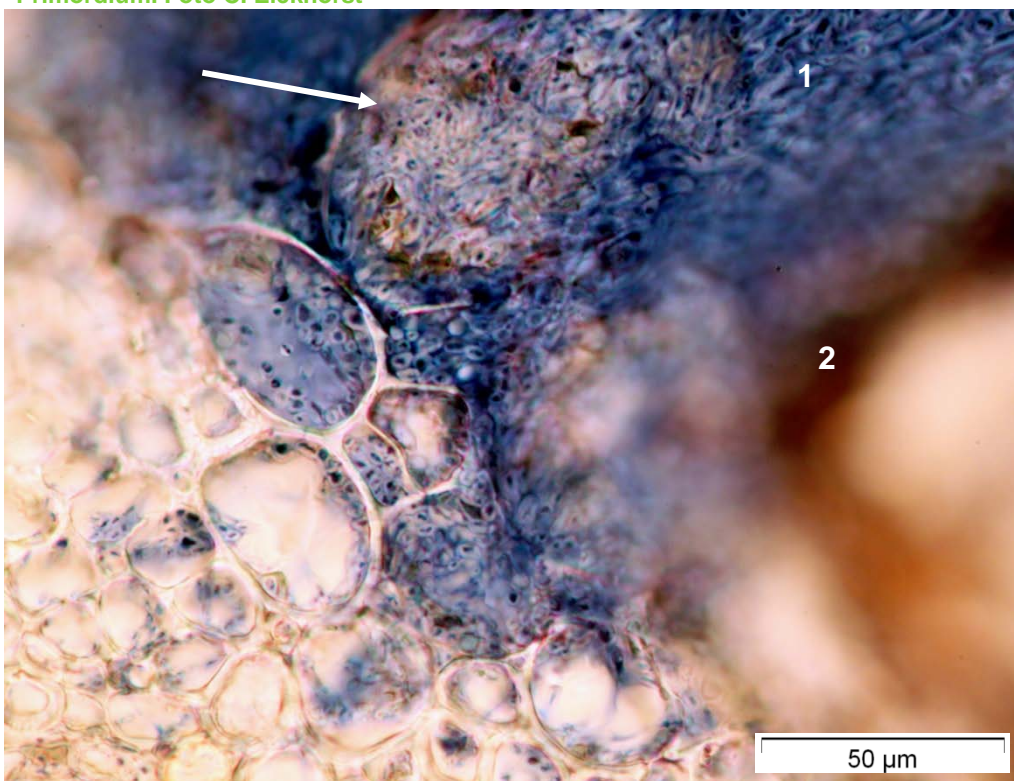


Abbildung 4.11: Mit Trypanblau gefärbte Fruchtkörperbasis von *Hymenoscyphus* spp. auf einem Eschenblattstiel von *Fraxinus excelsior*. Pilzliche Strukturen sind blau gefärbt, ungefärbt sind die Pflanzenzellen. 1: Plektenchym, 2: Excipulum, weißer Pfeil: Primordium. Foto C. Eickhorst

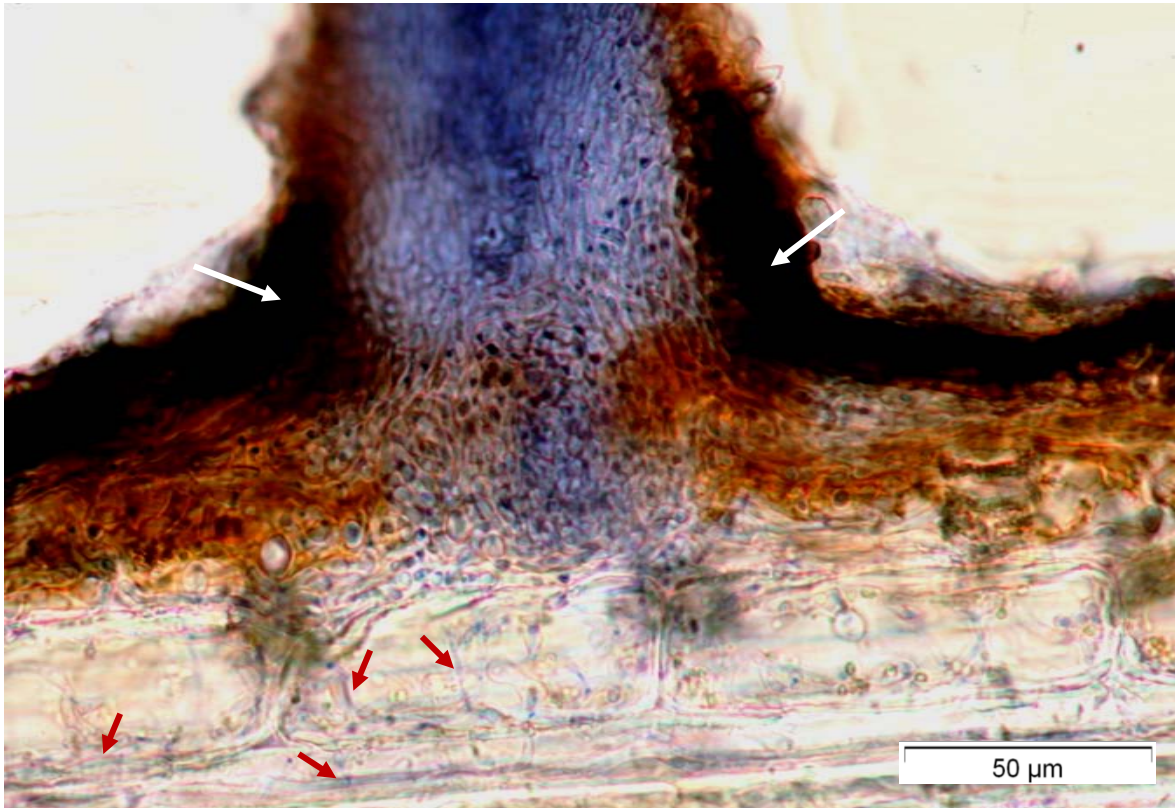


Abbildung 4.12: Mit Trypanblau gefärbte Fruchtkörperbasis von *Hymenoscyphus* spp. auf einem Eschenblattstiel von *Fraxinus excelsior*. Pilzliche Strukturen sind blau gefärbt, ungefärbt sind die Pflanzenzellen. weiße Pfeile: Pflanzenepidermis, rote Pfeile: angefärbte Hyphen. Foto C. Eickhorst

Abbildung 4.12 zeigt den unteren Abschnitt eines jungen Fruchtkörpers. Die Epidermis (weiße Pfeile) an der Aufbruchsstelle ist infolge des nach außen gerichteten Wachstums des Myzels stark aufgeworfen. Besonders in diesem frühen Entwicklungsstadium beschränkt sich das Hyphenwachstum auf den Bereich unterhalb der Fruchtkörperbasis. Die langgestreckten zylindrischen Zellen des Kollenchyms enthalten nur wenige Hyphen (rote Pfeile). Im Querschnitt des noch nicht vollständig ausgereiften Ascus (Abb. 4.13) ist erneut neben dem äußeren (1) auch das innere (2) Excipulum dargestellt, welche beide aus sterilen Hyphen bestehen. Das äußere Excipulum, auch Amphithecium genannt, bildet die Begrenzung des Fruchtkörpers nach außen. Das innere Excipulum (Parathecium) grenzt an das Hymenium.

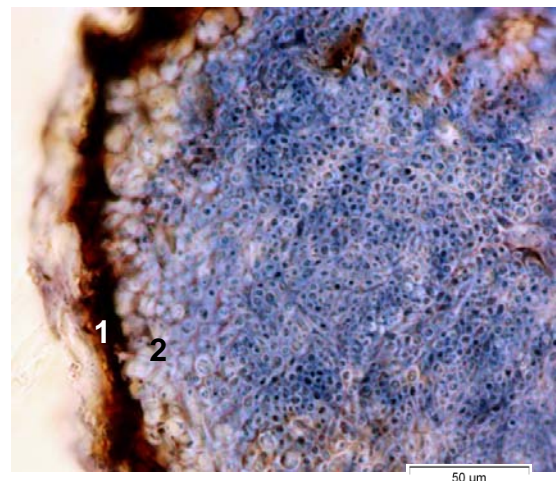


Abbildung 4.13: Querschnitt eines jungen Fruchtkörpers von *Hymenoscyphus* spp., gefärbt mit Trypanblau. 1: Amphithecium, 2: Parathecium. Fotos C. Eickhorst

4.2.2 Mikroskopische Merkmale des Anamorph

Die Konidien, welche vom Anamorph (*Chalara fraxinea*) von *H. pseudoalbidus* gebildet werden, sind in der REM-Aufnahme (Abb. 4.14) dargestellt. Wie auch in der lichtmikroskopischen Aufnahmen zu sehen (Abb. 4.15, blauer Pfeil), bilden die sie sogenannte Cluster, in denen sie zusammenhängen. Dabei werden sie von einer, wie in diesen Aufnahmen deutlich wird, netzartigen Struktur oder Schleimhülle zusammengehalten. Die leichte Deformierung der Konidien in der REM-Aufnahme kommt durch den Trocknungsprozess zustande, weshalb sie normalerweise eher kugelig erscheinen.

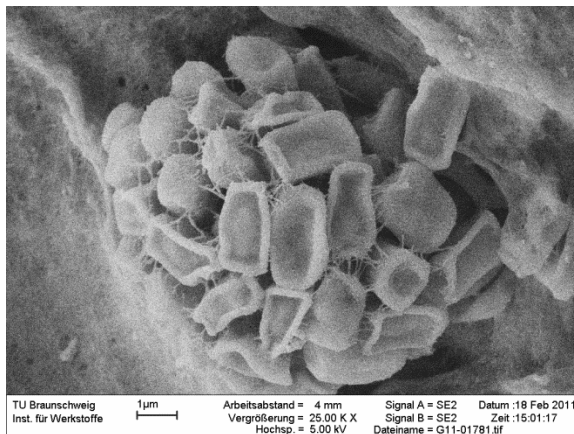


Abbildung 4.14: REM-Aufnahme von Konidien isoliert aus einer Kultur des Anamorph von *H. p.*
Foto J. de Vries

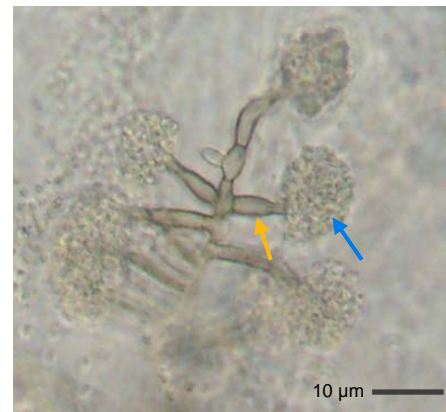


Abbildung 4.15: Mikroskopische Aufnahme einer Kultur des Anamorph von *H. p.* mit Phialiden (gelber Pfeil) und Konidien (blauer Pfeil). Foto C.

Die vegetativen Hyphen stellen sich wie auch in der Literatur beschrieben, meist farblos bis schwach braun dar und haben einen Durchmesser von 1 - 2,5 µm (Kowalski, 2006, Schumacher et al., 2007), je nach Alter des Myzels. Bei Langzeitkulturen auf einem mageren Medium, wie dem KM - Agar, welches nur wenig Nährstoffe liefert, konnten sich die bereits oben gezeigten, morphologisch charakteristische Strukturen, wie Phialiden, Phialophoren und Konidien beobachtet werden. Die Phialophoren, welche meist in reduzierter Form, den Phialiden, vorliegen, sind keulenförmig und zweigen sich seitlich von den vegetativen Hyphen ab (Abb. 4.15, gelber Pfeil).

4.2.3 Kultureigenschaften des Anamorph

Aufgrund der Vielzahl der verschiedenen anamorphen Isolate sollten, unter anderem für spätere Korrelationsüberprüfungen mit der Virulenz und/ oder der genetischen Variabilität, diese makroskopisch untersucht werden (Kap. 3.6.1).

Die Kultivierung der Stämme bei verschiedenen Temperaturen hat ergeben, dass das Wachstumsoptimum zwischen 20 - 25 °C liegt (Abb. 4.16). Dabei war es unabhängig davon auf welchem Medium die Stämme kultiviert wurden.

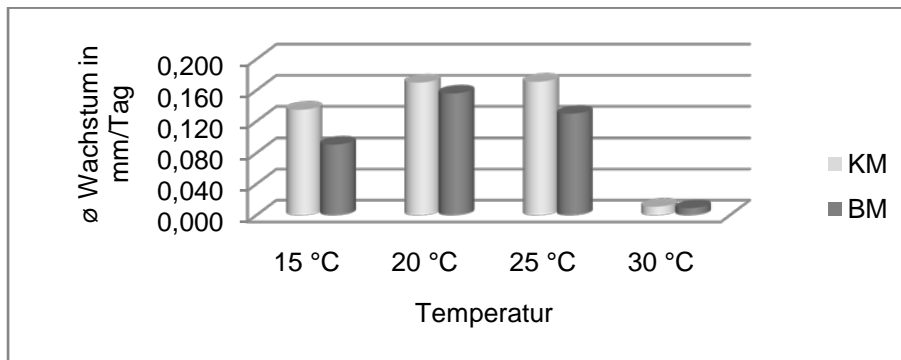


Abbildung 4.16: Durchschnittliches Wachstum von 30 Stämmen von *H. p.* bei Kultivierung auf KM-Agar und BM-Agar bei 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C im Dunkeln (3 Parallelen pro Pilz und Medium).

Bei allen Isolaten dauerte es ca. 1 Woche, bis es zum Wachstumsbeginn auf dem Medium kam. Unterschiede des Mediums betreffend, zeigten sich erst bei der Auswertung der Wachstumsgeschwindigkeit. 50% aller Isolate wuchsen auf Biomalzmedium (BM) nur langsam (0 - 0,10 cm/Tag), während es auf dem Kartoffel-Möhre-Medium (KM) nur noch 29 % waren (Abb. 4.17 und 4.18). Dementsprechend wuchsen 53% der Isolate mittelschnell (0,11 - 0,20 cm/Tag) und 18% relativ schnell (0,21 - x cm/Tag) auf KM-Agar.

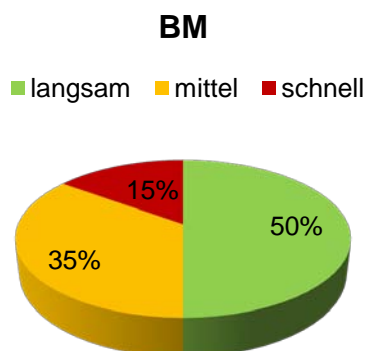


Abbildung 4.17: Verteilung der Isolate (in %) in Bezug auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit auf Biomalz - Agar bei 20 °C.

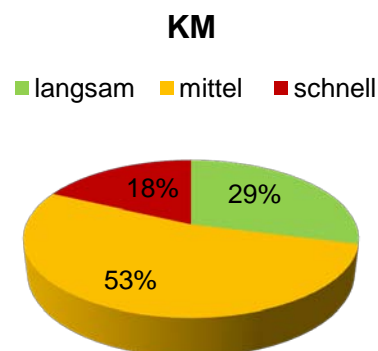


Abbildung 4.18: Verteilung der Isolate (in %) in Bezug auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit auf Kartoffel - Möhre - Agar bei 20 °C.

Abbildung 4.19 zeigt exemplarisch einige Stämme kultiviert auf KM - Agar und BM - Agar. Es wurde deutlich, dass es auch zu unterschiedlich schnellem Wachstum bei ein und demselben Isolat kam. So wuchsen C 444 und C 509 auf KM - Agar schnell und auf BM - Agar nur mittelschnell. Im Beispiel von C 415 verhielt es sich umgedreht. Insgesamt haben 60% der Isolate auf beiden Medien eine ähnliche Wachstumsgeschwindigkeit (alle Daten siehe Tab. 9.2, Anhang). Diese Bandbreite der Variation spiegelt sich auch in ihrem optischen Erscheinungsbild wider.

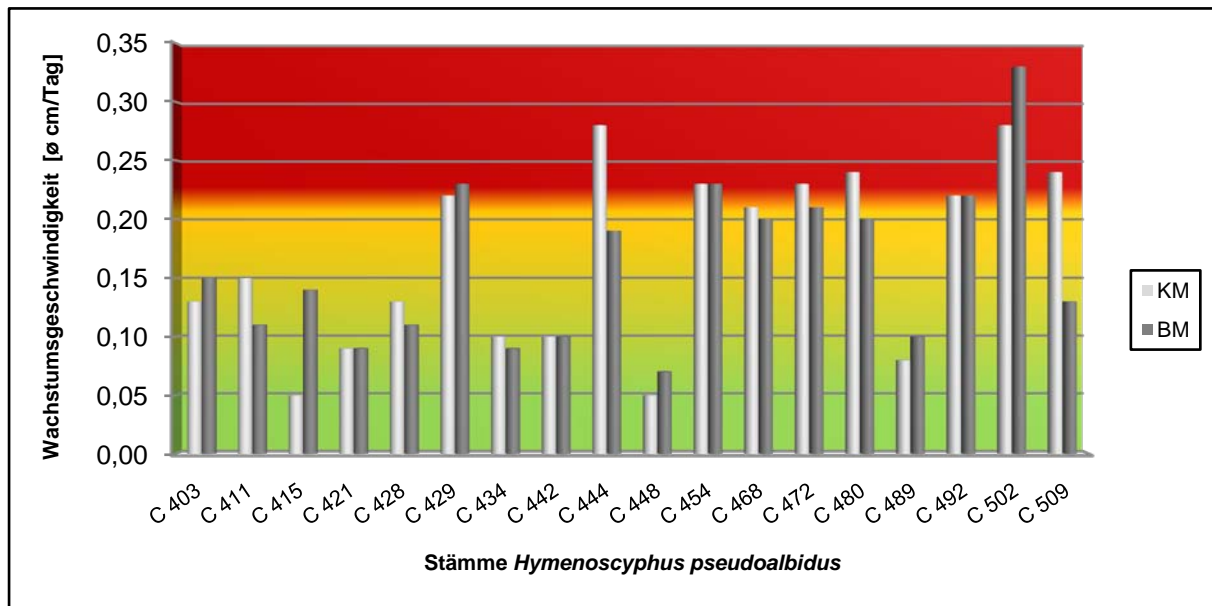


Abbildung 4.19: Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* auf KM - Agar (hellgraue Balken) und BM - Agar (dunkelgraue Balken) anhand einiger exemplarisch ausgewählten Isolate (2 Parallele). Die verschiedenen Farben im Diagrammhintergrund stellen die unterschiedlichen Bereiche der Wachstumsgeschwindigkeit dar. Grün: 0 bis 0,10 cm/Tag; Gelb: 0,11 bis 0,20 cm/Tag; Rot: 0,21 bis x cm/Tag.

Tabelle 4.1, ein Auszug der Beschreibungen der Stämme, gibt die Verschiedenheit der Isolate in Bezug auf das Aussehen des Luftmyzels wieder. Alle Isolate unterscheiden sich im Aussehen, vor allem beim Vergleich des Wachstums auf den zwei Medien. Zu Beginn der Kultivierung bilden zunächst alle ein weißliches dünnes Luftmyzel, welches sich in seiner Färbung meist von der Mitte der Kolonie her mit fortschreitendem Alter der Kultur verändert. Wie in den Abbildungen 4.20 zu sehen, bildeten die Kolonien auf dem KM - Medium (jeweils rechtes Bild) ein Luftmyzel in verschiedenen Weiß- und Grautönen, welches ein meist dünnes und flaches Erscheinungsbild hat. Hingegen konnte bei den Isolaten auf dem BM - Agar (jeweils linkes Bild) die größte Vielfalt in Bezug auf Farbgebung, Kompaktheit und Gleichmäßigkeit des Luftmyzels beobachtet werden. Hier entwickelten sich alle Schattierungen von gelb über braun, weiß und grau.

Tabelle 4.1: Makroskopischen Beschaffenheit und Farbe des Myzels einiger Stämme von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* kultiviert auf Kartoffel-Möhre-Agar (KM) und Biomalzagar (BM). ungl.=ungleichmäßig.

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit des Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 403	reinweiß	grauweiß mit leichtem Grünschimmer, gelbbraune Verfärbung der Mitte	fusselig, ungl., Aufspaltung	eben, flaumig
C 415	reinweiß	reinweiß, elfenbein	pudrig, dicht, flach	eben, dicht
C 421	reinweiß mit safrangelben Verfärbungen der Mitte	elfenbein in der Wachstumszone, currygelb in der Mitte	flaumig, flach	pudrig, kompakt
C 428	reinweiß	hellelfenbein, gelbbraun, honiggelb	Segmentbildung, ungleichmäßig, ringartig	ungl., uneben, fusselig
C 429	verkehrsweiß	hellelfenbein, seidenmatt weiß mit elfenbeinfarbenen Flecken	flaumig, strahlenförmig	dünn, pudrig, ungl.
C 444	reinweiß, leichte Verfärbung zu elfenbein in der Mitte	elfenbein mit gelbbraunen Flecken	Zonen, samtig, teilweise dünn	Zonen, ungl., eben, fusselig
C 448	cremeweiß	zentral curry- und ginstergelb, verkehrsweißer Rand	pudrig, ungleichmäßig	dicht, flach, ungl.
C 468	reinweiß	gelbbraun, dahliengelbe Ringe	pudrig, dünn, strahlenförmig, fest	samtig, ringartig
C 472	cremeweiß	seidenmatt weiß, ginstergelb, ockerbraun unregelmäßige Verfärbung	flach, dünn, pudrig	unregelmäßig, uneben, teilweise flaumig
C 489	reinweiß, cremeweiß, sternförmig verfärbte Mitte	safrangelb, melonengelb, verfärbte Mitte	samtig, strahlen- und sternenförmig	ungl., blumenförmiger Rand, Aufspaltung, samtig
C 492	reinweiß	hellelfenbein, safrangelbe Flecken	sehr dünn, flach	ungl., pudrig, Zonen
C 502	reinweiß	seidenmatt weiß	glatt, sehr dünn	ungl., puderartig, stellenweise flaumig
C 509	reinweiß	cremeweiß/signalweiß, currygelbe, ginstergelbe Verfärbung der Mitte mit vereinzelt kleinen Flecken	pudrig, ungleichmäßig, Segmentbildung, flach	ungl., welliger Rand, kompakt, samtig pudrig

Die Charakterisierung aller Stämme ist in Tabelle 9.1 im Anhang zusammengefasst.

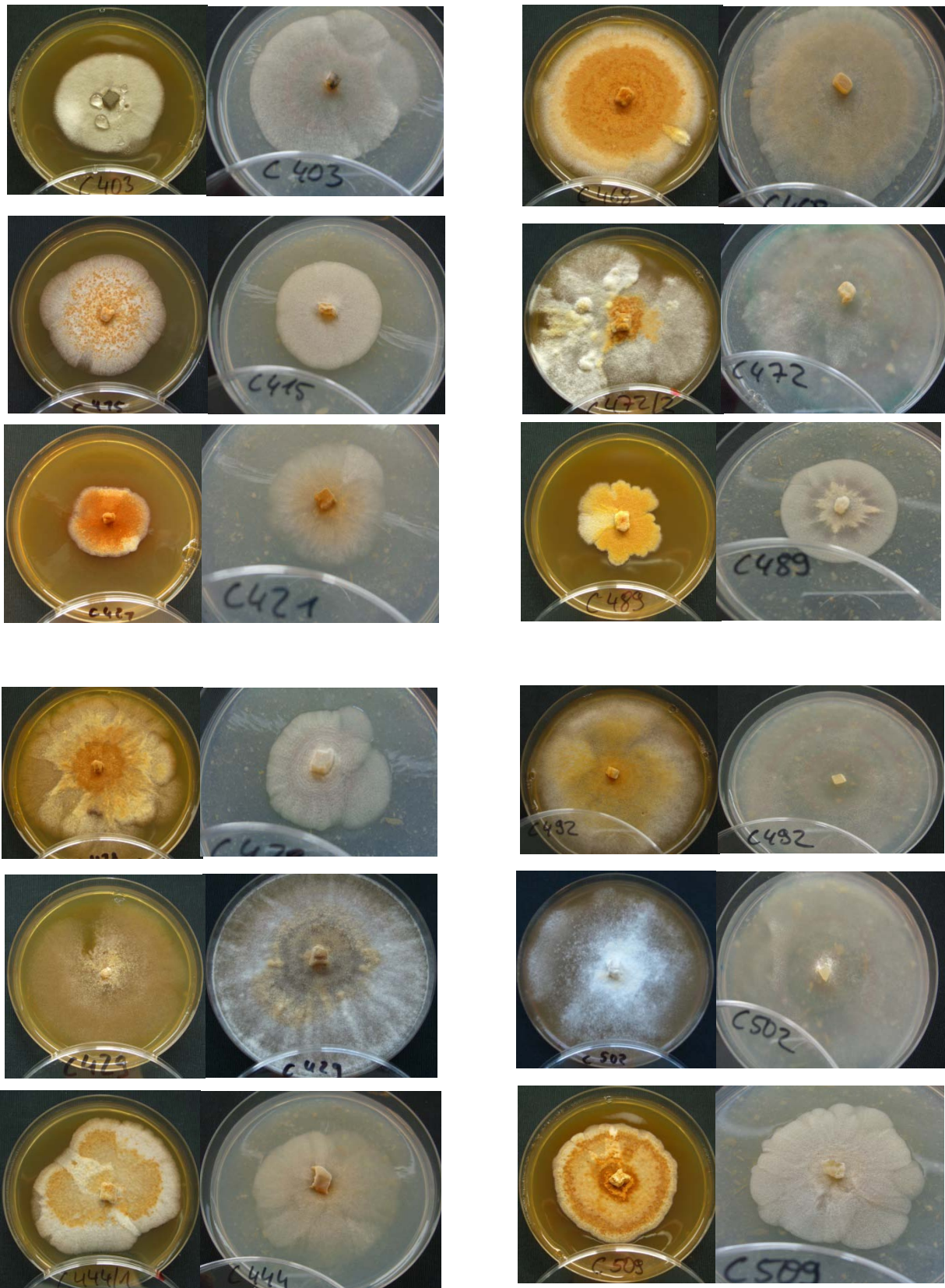


Abbildung 4.20: Makroskopische Ansicht von verschiedenen Kulturen von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* kultiviert auf Biomalz-Agar (jeweils linkes Foto) und KM-Agar (jeweils rechtes Foto) bei RT. Fotos C. Junker

4.2.4 Vegetative Kompatibilität

Die Untersuchung der Isolate auf Bildung von Anastomosen untereinander war eine der Voruntersuchungen zur Erforschung der genetischen Variationsbreite des Erregers. Dafür wurden, wie beschrieben (Kap.3.6.3), die Isolate gegeneinander geimpft. Trotz mehrmaliger Wiederholung des Versuchs und unter Verwendung anderer Kombinationen von Isolaten, war eine Auswertung der Dualkulturen in Bezug auf Anastomosenbildung nicht möglich. Es kam nach einem gewissen Zeitpunkt der Kultivierung, welche sich aufgrund der Langsamkeit des Pilzwachstums über zwei Monate erstreckte, zu einem Stillstand des Wachstums beider Kolonien. In anderen Fällen, konnte sogar ein verschlechtertes Wachstum oder gar keine Bildung von Luftmyzel bei einer der beiden Kolonien beobachtet werden. Zur Ausbildung einer Demarkationslinie bzw. zum Zusammenwachsen der Hyphen kam es bis jetzt in keiner der Dualkulturen (Abb. 4.21 rechte Aufnahmen). Nur in den selbst-selbst-Interaktionen (Abb. 4.21 linke Aufnahmen) konnte ein Zusammenwachsen beobachtet werden.



Abbildung 4.21: vc-Tests mit Isolaten von *H. p.* auf Kartoffel-Glucose-Agar, versetzt mit roter Lebensmittelfarbe. Kultivierung 2 Monate in Dunkelheit und RT. Links: Selbst-Selbst Interaktionen, Rechts: Jeweils zwei verschiedene Isolate.

4.3 ITS-Sequenzierungen

Zur Verifizierung der genauen Zugehörigkeit der Isolate zu *H. pseudoalbidus* oder *H. albidus*, wurden nach der Amplifizierung der rDNA mit den Primern ITS1 und ITS4 (Kap. 3.8), sowie anschließender Sequenzierung durch GATC Biotech die erhaltenen ITS-Sequenzen mit der in der Datenbank von NCBI Blast® (blastn) bereits enthaltenen Sequenzen von Queloz et al. (2011) abgeglichen. Verglichen mit diesen Sequenzinformationen konnte mit 99 bis 100%iger Übereinstimmung eine Zuordnung aller Isolate zu *Hymenoscyphus pseudoalbidus* erfolgen. Innerhalb der in Tabelle 4.2 untersuchten 27 Isolate war die Sequenzübereinstimmung für den ITS1/ITS4 Locus 100%. Ausnahme war hier allerdings das Isolat C 421, bei dem ein Basenpaar unterschiedlich war. Die Auswahl der Isolate war z.T. willkürlich und abhängig davon, von welchen gefriergetrocknetes Myzel zur Gewinnung von DNA vorlag (Kap. 3.7). Alle Isolate (Tab. 3.1) konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr sequenziert werden. Abbildung 4.22 zeigt ein Agarosegel mit ITS1/ITS4 PCR-Produkten verschiedener Isolate, welche eine Größe von 550 bp aufwiesen.

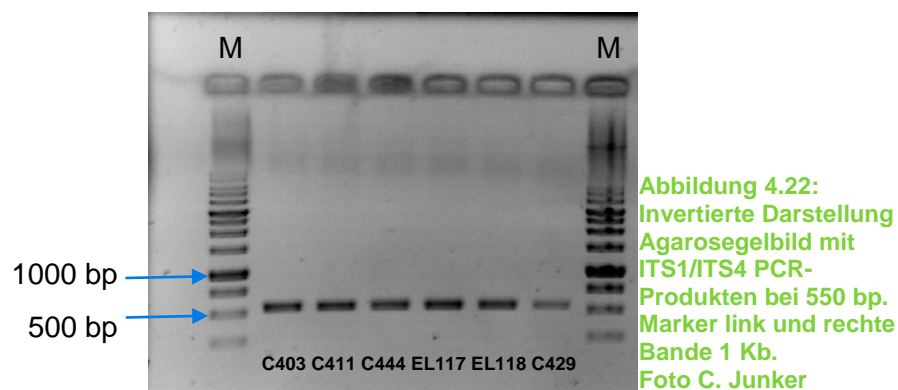


Tabelle 4.2: ITS-Sequenzierung diverser Stämme von *H. p.* zur Verifizierung der genauen Taxonzugehörigkeit. Isolat 090812.3a als Referenzstamm.

Isolat-Nr.	Art
C 401	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 403	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 408	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 411	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 421	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 428	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 429	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 434	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 436	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 444	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>

Isolat-Nr.	Art
C 454	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 465	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 470	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 472	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 480	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 489	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 490	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 491	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 492	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 502	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 509	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
C 531	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
EL 112	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
EL 115	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
EL 117	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
EL 118	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
EL 120	<i>Hymenoscyphus pseudoalbidus</i>
090812.3a	<i>Hymenoscyphus albidus</i>

Informationen und Sequenzdaten zu einigen der Isolate sind bei NCBI Blast unter den Nummern KC576528 bis KC576539 hinterlegt.

4.4 Exoenzymproduktion

Der qualitative Nachweis der Exoenzyme, und damit möglicher Virulenzfaktoren aller 175 Isolate geschah mittels einfacher Farbreaktionen in verschiedenen Spezialmedien (Kap. 3.7). Dabei wurden sowohl Enzyme, verantwortlich für den Cellulose und Ligninabbau, als auch Fett und Stärke degradierende Enzyme untersucht. Es wurde für jeden Stamm ein eigenes Exoenzymprofil erstellt, welches allerdings keine Aussagen über die Quantität der produzierten Enzyme zulässt. Es zeigte sich, dass einige Isolate ein beinahe individuelles Profil, bestehend aus den acht untersuchten Enzymen, zu haben scheinen. Die Vergleiche ergaben, dass viele Stämme mindestens 6 von 8 Übereinstimmungen aufweisen. Ein Stamm (C 404) beispielsweise, hat mit 40% aller Stämme, 6 von 8 Übereinstimmungen und mit 3% ein identisches Profil. Das Isolat C 416 hingegen hat ein einzigartiges Enzymprofil.

In Abbildung 4.23 ist eine Übersicht darüber gegeben, welche der untersuchten Exoenzyme am häufigsten von den Isolaten produziert wurden. Das ligninabbauende Enzym Tyrosinase kommt dabei unter den Isolaten mit 97% am

häufigsten vor. Ebenso die für den Fettabbau verantwortliche Lipase ist mit 95% ein von den meisten Stämmen produziertes Enzym. Die β -Glucosidase (Glucoseabbau), als auch die Laccase (Ligninabbau) werden mit 87% und 74% noch von vielen der Stämme produziert. Am wenigsten wird das Enzym Cellulase mit nur 14% unter den Isolaten gebildet.

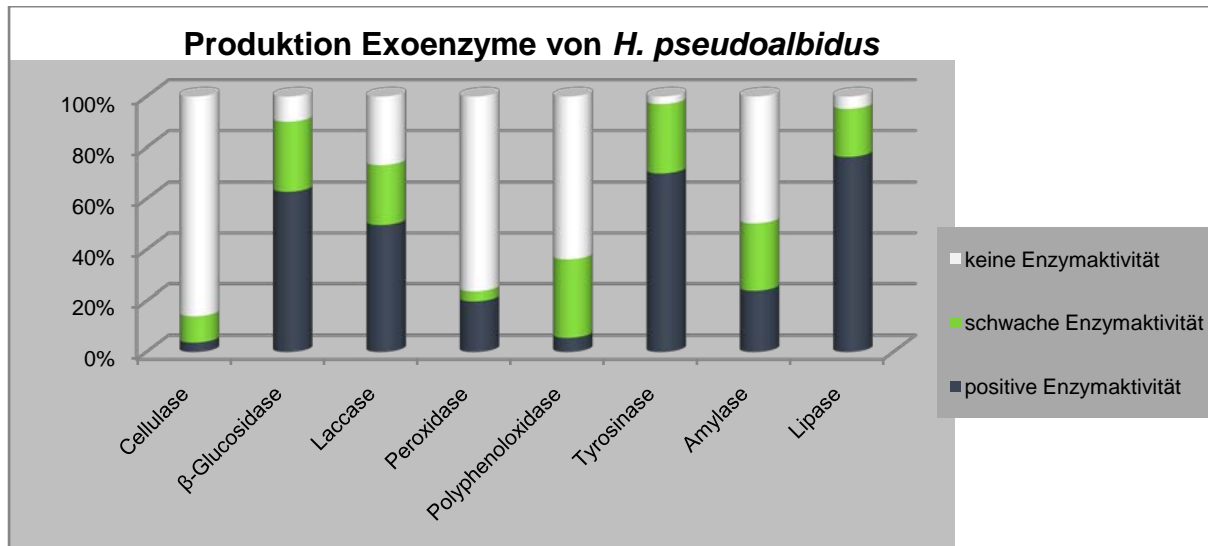


Abbildung 4.23: Prozentualer Anteil der Isolaten von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, die das jeweilig untersuchte Exoenzym produzieren. Dabei wurde unterschieden zwischen keiner Aktivität, schwacher Aktivität und starke Aktivität des Enzyms aufgrund der Intensität der Farbreaktion.

4.5 Dünnschichtchromatographie der Pilzkulturextrakte

Um später Aussagen darüber machen zu können, ob womöglich ein Sekundärstoff oder eine Kombination aus mehreren Stoffen für die Virulenz verantwortlich bzw. mitverantwortlich ist, wurden von den hergestellten Pilzkulturextrakten (Kap. 3.10) Dünnschichtchromatographien angefertigt (Kap. 3.11), um das Metabolitenprofil zu charakterisieren.

Es wurde untersucht, inwieweit es, wie auch schon bei den Exoenzymen, Unterschiede bei der Produktion von Sekundärmetaboliten gibt. Da dies Medienabhängig ist, wurden die Pilzstämme auf zwei unterschiedlichen Medien kultiviert (Kap. 3.10). Die Abbildungen 4.24 und 4.25 zeigen exemplarisch zwei der Dünnschichtchromatographien. Beim Auftragen der Pilzkulturextrakte wurden immer der Biomalzkulturextrakt (BM) und der DiGe-Kulturextrakt (DiGe) desselben Pilzstammes nebeneinander aufgetragen. Insgesamt wird deutlich, dass alle Stämme viele Metabolite produzieren, die sowohl zu den ungesättigten organischen Substanzen (UV-Licht-Detektion) gehören, als auch zu den Zuckern und Fetten

(Verkohlung; Cazes, 2001). Vergleicht man im Einzelnen zum Beispiel C 403 BM mit C 411 BM, so erhält man schon beim einfachen Auszählen der unter UV-Licht (Abb. 4.24) sichtbar gewordenen Banden, dass der Stamm C 411 BM mehr Banden aufweist, als C 403. Am deutlichsten wird dies bei C 415 DiGe, mit nur 9 Banden im Vergleich zum Durchschnitt von 15 Banden/Extrakt für alle getesteten Isolate. Vergleicht man zudem die Anzahl der Substanzen, gebildet auf BM-Agar, mit denen auf DiGe so liegt sie in den BM-Kulturextrakte immer höher, oder ist maximal identisch. Das heißt, dass die Stämme auf dem Biomalzmedium eine höhere Produktion von Sekundärstoffen haben, als auf Dinkel-Gerste. Bei den verkohlbaren Substanzen (Abb. 4.25) zeigt sich eine deutlich geringere Anzahl von Banden, welche sich zudem nur in der unteren Hälfte der DC-Platte befinden. Auch hier unterscheiden sich die einzelnen Stämme vor allem durch eine unterschiedliche

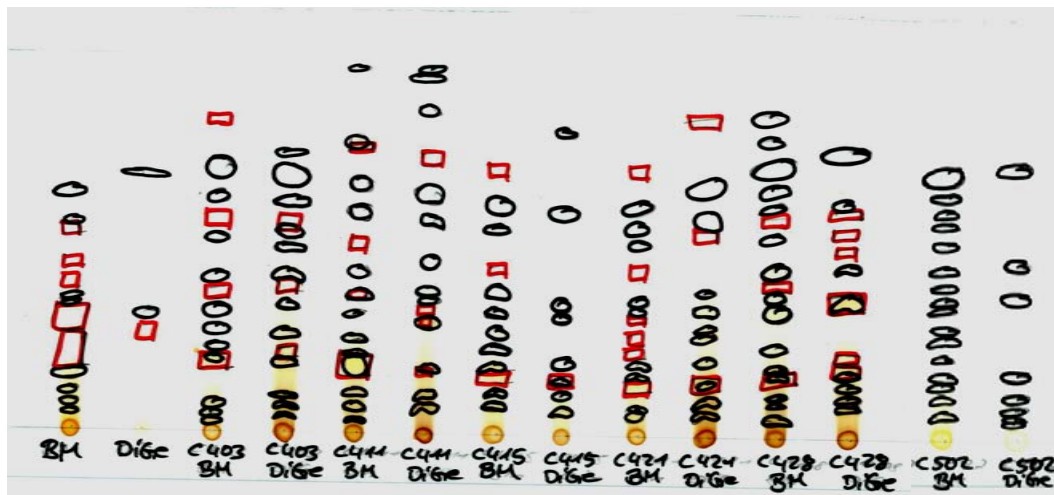


Abbildung 4.24: Dünnschichtchromatographien von Pilzkulturextrakten kultiviert auf Biomalzagar (BM) und Dinkel-Gerste-Medium (DiGe). Auswertung und Detektion der Banden unter UV-Licht mit den Wellenlängen 366 nm (schwarze Umrandung) und 254 nm (rote Umrandung).

Farbgebung der Banden, welche blaue, graue, braune, rote und gelbe Töne aufweisen und auf unterschiedliche Metaboliten hinweisen. Beim Vergleich aller Profile (nicht dargestellt) zeigt sich, dass jedes Isolat ein eigenes Spektrum von Metaboliten produziert, bei dem nur vereinzelt identische Banden bei mehreren Isolaten zu finden sind. Zusätzlich fällt unter allen aufgetragenen Extrakten (42) das Spektrum von C 502 auf, wo sowohl beim BM- als auch beim DiGe- Extrakt keine Banden bei 254 nm (rote Umrandung) sichtbar waren (Abb. 4.24, rechter Ausschnitt DC). Ähnlich verhält es sich bei der verkohlten Chromatographie. Waren bei den anderen BM-Extrakten immer eine mehr oder wenig stark ausgeprägte rotbraune

Bande (Rf 0,18) sichtbar (Abb. 4.25, schwarze Pfeile), so kommt diese wieder bei C 502 nicht vor.

Eine genaue chemische Analyse, um welche Metabolite es sich handeln könnte, fand anhand der Dünnschichtchromatogramme nicht mehr statt.

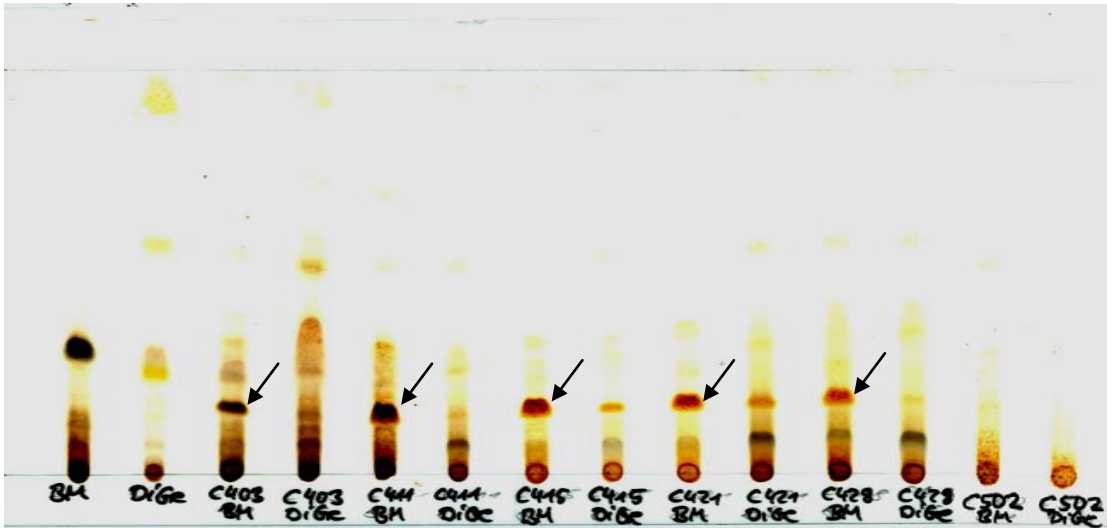


Abbildung 4.25: Dünnschichtchromatographien von Pilzkulturextrakten kultiviert auf Biomalzagar (BM) und Dinkel-Gerste-Medium (DiGe). Auswertung und Detektion der Banden durch Besprühen der Platte mit 5 % H_2SO_4 in Ethanol und 10 minütiger Inkubation bei 110 °C (Verkohlung). Schwarze Pfeile deuten auf eine bei allen (Ausnahme C 502) BM-Extrakten und einigen DiGe-Extrakten vorkommende Bande (Rf 0,18).

4.6 Nachweis von Viridiol mittels GC-MS

Viridiol, eine als vermutlich virulent gegen Eschen geltende Substanz (Andersson et al., 2010), sollte in Kulturextrakten von *H. pseudoalbidus* und *H. albidus* nachgewiesen werden. Eine gute Möglichkeit dazu bot der Nachweis mittels GC-MS (Kap. 3.12), welche in Zusammenarbeit mit der AG Ebel, University Aberdeen, aber auch zum Teil mit der AG Dickschat, TU Braunschweig, durchgeführt wurde. Hierbei wurde Viridiol wie in Tabelle 4.3 zusammengefasst in μg pro ml Kulturextrakt aus den gewonnenen Messdaten berechnet. Die Messung zeigte deutliche Konzentrationsunterschiede bei den Isolaten von *H. pseudoalbidus*. Bei vier (C 403, C 429, C 472, C502) der zwölf getesteten Isolate konnte kein Viridiol nachgewiesen werden und auch bei C 428, C 489, C 492 und dem Isolate aus dem Elm EL 120 wurden nur geringe Konzentrationen der Substanz gemessen. Hingegen konnte eine wesentlich höhere Konzentration in den Extrakt von C 411, C 444 und C 421 festgestellt werden. Zwar fehlt in dieser Messung bei C421 die Angabe eines absoluten Wertes, da aber bei der Auswertung ein hoher Peak ermittelt wurde, kann hier aber davon ausgegangen werden, dass Viridiol in relativ großen Mengen produziert worden ist. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass der Extrakt zur

Gewinnung der Reinsubstanz, wichtig für die Kalibrierung der Messung, genutzt und verbraucht wurde und erlaubte nur eine geschätzte Quantifizierung mittels zweimal +. Die absolute Zahl (hier dargestellt in Klammern) stammt aus einer anderen Messreihe, welche schon einmal zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt wurde.

Tabelle 4.3: Vorhandensein von Viridiol in Kulturextrakte von verschiedenen Isolaten von *H. pseudoalbidus* und *H. albidus*. - = kein Viridiol detektiert; ++ = hohe Konzentration gemessen, aber nicht quantifiziert, ()angegebener Wert stammt aus anderer Messung; (+) = Viridiol vorhanden, aber Wert liegt unter Nachweisgrenze; grün unterlegt = kein Viridiol; rot unterlegt= hohe Viridiolkonzentration, D=Deutschland, PL=Polen, CH=Schweiz, F=Frankreich.

Isolat	Teleomorph	Herkunft	µg Viridiol pro mg Pilzkulturextrakt
C 403	<i>H. pseudoalbidus</i>	Hamburg, D	█
C 411	<i>H. pseudoalbidus</i>	Uelzen, D	77,2
C 421	<i>H. pseudoalbidus</i>	Pinneberg, D	++ (43,5)
C 428	<i>H. pseudoalbidus</i>	Mircze, PL	2,33
C 429	<i>H. pseudoalbidus</i>	Mircze, PL	█
C 444	<i>H. pseudoalbidus</i>	Nauen, D	80.6
C 472	<i>H. pseudoalbidus</i>	Ellerhoop, D	█
C 489	<i>H. pseudoalbidus</i>	Ellerhoop, D	0,02
C 492	<i>H. pseudoalbidus</i>	Ellerhoop, D	0,55
C 502	<i>H. pseudoalbidus</i>	Ellerhoop, D	█
C 509	<i>H. pseudoalbidus</i>	Ellerhoop, D	24,9
EL 120	<i>H. pseudoalbidus</i>	Erkerode, D	3,82
090812.3a	<i>H. albidus</i>	Leukerbad, CH	132
Car1	<i>H. albidus</i>	Carnac, F	0,21
Car5	<i>H. albidus</i>	Carnac, F	0,08
Car6	<i>H. albidus</i>	Carnac, F	(+)
Car7	<i>H. albidus</i>	Carnac, F	1,41

Dem gegenüber stehen die gemessenen Werte der Kulturextrakte von *H. albidus*, bei denen ebenfalls das als Virulenzfaktor geltende Viridiol nachgewiesen wurde. Die Viridiolkonzentrationen liegen im selben Bereich wie die von *H. pseudoalbidus*. Aber vor allem das Isolat aus der Schweiz (090812.3a) wies mit 132 µg/mg Kulturextrakt eine sehr hohe Konzentration auf, welcher im Vergleich von beispielsweise C 489 6600 fach über dessen Konzentration liegt. Die Werte der

Isolate aus Frankreich (Car1, 5, 7) rangieren eher im unteren Messbereich, ähnlich den Isolaten C 428, C 489, C 492 und EI 120 von *H. pseudoalbidus*. Bei Car6 wurde die Substanz zwar nachgewiesen, allerdings in so geringen Mengen, dass der Wert unter die Nachweisgrenze fiel.

4.7 Vorzeitige Dormanzbrechung von *Fraxinus excelsior*

Für *in vitro* Infektionsversuche mit der Wirtspflanze sollten aus Samen von *Fraxinus excelsior* Sämlinge angezogen werden. Auf natürliche Weise bedarf es dafür einer acht monatigen Stratifizierungsphase, die eine Lagerung der Samen in feuchtem Quarzsand unter sterilen Bedingungen und bei 20 °C bzw. 4 °C vorsieht. Diese Methode erbrachte allerdings nicht die erhoffte Anzahl an sterilen Eschensämlingen, da die meisten Töpfe bereits vor dem Auskeimen der Samen mit Pilzen kontaminiert waren. Zudem war die Ausbeute der Samen, die auskeimten, sehr gering. Um trotzdem die geplanten Infektionsversuche durchführen zu können, wurde eine weitere Methode zur Anzucht von Eschen ausprobiert. Die Schnellanzucht von Eschensamen, nach Raquin et al. (2002) optimiert, stellte sich als eine zeitsparende und effiziente Methode dar, viele Eschensämlinge nach Bedarf anzuziehen. Dies ermöglichte eine viel flexiblere Versuchsgestaltung. Die vorbehandelten Samen (Kap. 3.14) wurden zunächst in Petrischalen angezogen (Abb. 4.26) und nach dem Ausbilden von Spross, Wurzeln und Blättern in Reagenzgläser umgesetzt, um ihnen ein besseres Streckungswachstum zu ermöglichen. Mit dieser Methode konnte eine Ausbeute von 92,5% erzielt werden. Das bedeutet, dass fast alle stratifizierten Samen ohne Kontaminationen zum Auskeimen gebracht und danach steril weiterkultiviert werden konnten. Im Laufe der Arbeit wurden die Sämlinge statt in Reagenzgläsern in Babygläsern (Abb. 4.27) weiter angezogen, da diese ihnen eine noch besser und stressfreiere Entwicklung ermöglichten. Zudem konnten die Sämlinge darin bis zu ca. drei Monaten kultiviert werden, was eine Verlängerung der Inkubationszeit nach Inokulation mit dem Pathogen ermöglichte.



Abbildung 4.26: 7 Tage alte axenische Eschensämlinge ausgelegt auf H₁₀-Agar in Petrischalen (Ø 9cm). Foto C. Junker



Abbildung 4.27: Zwei Monate alter Eschensämling auf H₁₀-Agar im Babyglas (9x6 cm). Foto C. Junker

4.8 In vitro Virulenz- Untersuchungen

Im Folgenden wurden verschiedene sogenannte Bio-Schnelltests durchgeführt, welche einen Anhaltspunkt für die unterschiedliche Virulenz einiger Isolate von *H. pseudoalbidus* liefern sollten. Dabei wurden sowohl die aus Pilzkulturen gewonnenen Extrakte verwendet, die verschiedene Sekundärmetabolite enthalten (Kap. 3.10), als auch Inokulationen mit Myzel, von auf Festmedium kultivierten Stämmen, durchgeführt. Zudem wurden flüchtige Substanzen, gewonnen von Myzelkulturen von *H. p.*, welche im Verdacht stehen Virulenzfaktoren zu sein, getestet.

4.8.1 Flüchtige Substanzen aus *H. pseudoalbidus*

Der Nachweis von flüchtigen Substanzen war eine Möglichkeit, Stoffe zu finden, welche als Virulenzfaktoren fungieren könnten. Dabei konnten neben unbekannten Substanzen fünf Laktone (Abb. 4.28 Nr.1-5) identifiziert werden.

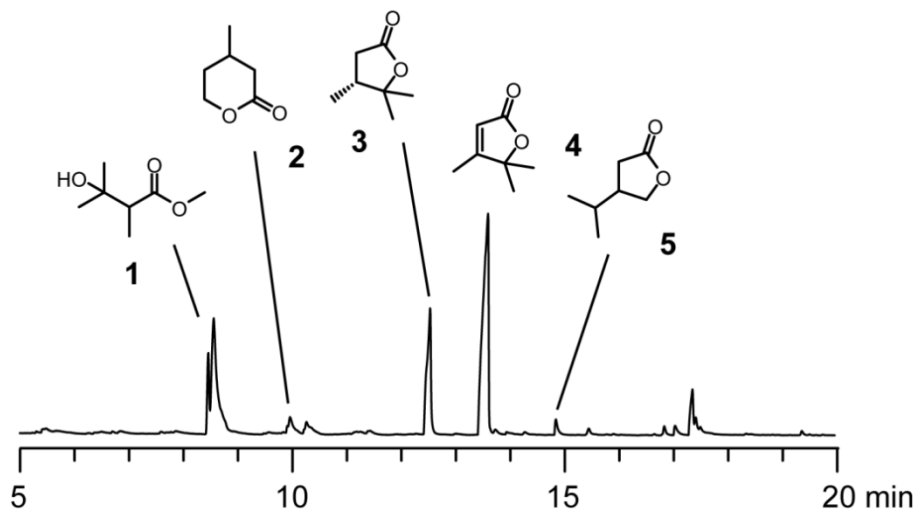


Abbildung 4.28: CLSA-Analyse mit anschließender GC-MS: Flüchtige Substanzen identifiziert von *H. pseudoalbidus*. Quelle: AG Dickschat

Um die mögliche Virulenz der Laktone zu überprüfen, wurden sie in einem Auskeimtest mit Eschensamen verwendet. Dem Anzuchtmedium für die Samen wurden die Laktone (1 mg/mL) zugegeben und darauf die vorbereiteten Samen (Kap. 3.14) für 14 d unter den Standardbedingungen inkubiert (3 Parallele à 8-10 Samen). Im Medium betrug die Endkonzentration des Lakton 0,1 mg/mL. Tabelle 4.4 fasst die Ergebnisse des Auskeimtests zusammen. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Samen (im Verhältnis zur Kontrolle, Abb. 4.29), die in der Lage waren, sowohl Spross als auch Kotyledonen zu entwickeln. Besonders toxisch war das

Lakton mit der Nummer 3, nach Behandlung damit war keiner der Samen mehr fähig vollständig auszukeimen. Lediglich ein kleiner Sprossansatz konnte aus dem gekappten Ende der Samen hervortreten, wie die Abbildung unter der entsprechenden Laktonnummer unter der Tabelle 4.4 (Pfeil nach unten) zeigt. Auch die anderen Laktone haben die Keimung gehemmt (Abb. 4.23), wenn auch nicht so stark wie Lakton Nr. 3.

Tabelle 4.4: Prozentualer Anteil der ausgekeimten Samen von *Fraxinus excelsior* (3 Parallele à 8-10 Samen). Angabe im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 4.29 unter Tabelle). Inkubation für 14 d bei 20 °C und 8 h Licht (800x10 Lux) auf H₁₀-Medium versetzt mit dem entsprechenden Lakton (0,1 mg/mL Endkonzentration im Medium). Pfeile unter der Tabelle verweisen auf die entsprechende Abbildung eines Lakton und dem Auskeimtest mit Samen. Fotos C. Junker

Auskeimung Samen <i>F. excelsior</i>				
58%	20%	0%	55%	40%
Lakton 1	Lakton 2	Lakton 3	Lakton 4	Lakton 5




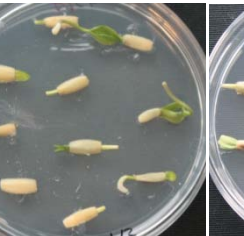









Abbildung 4.29:
Eschensamen nach 14
tägiger Inkubation auf H₁₀-
Medium mit
Lösungsmittel, bei 20 °C
und 8 h Licht (800x10
Lux). Foto C. Junker

Wie die Aufnahmen zu den Lakton1, 2, 4 und 5 zeigen, konnten hier zwar bis zu 58% der Samen keimen, wiesen aber einen hinter der Kontrolle liegenden Entwicklungsstand auf. Zumeist hatten die Kontrollsämlinge kräftiger Sprosse, an denen sich in einigen Fällen schon kleine Wurzeln (Abb. 4.29, rote Pfeile) ausbildeten.

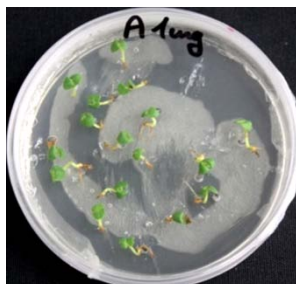


Abbildung 4.30:
Basilikumsamen nach 7
tägiger Inkubation auf H₁₀-
Medium mit Lakton Nr. 3, bei
20 °C und 8 h Licht (800x10
Lux). Foto C. Junker

Zur Überprüfung, ob die Laktone wirtsspezifisch agieren, wurde der Test analog mit Basilikumsamen durchgeführt. Nach entsprechender Vorbehandlung der Samen (Kap. 3.15.6.1) wurden pro Petrischale 18 Samen (3 Parallele) ausgelegt. Hierbei wurde allerdings nur das Lakton 3, mit der absoluten Keimhemmung getestet. Trotz Zugabe des Lakton keimten, wie

in Abbildung 4.30 zu sehen, alle Samen aus und wiesen weder Nekrosen noch Chlorosen auf.

4.8.2 Virulenztests mit Pilzkulturextrakten

Viele der im Kulturextrakt isolierten Sekundärmetaboliten sind Virulenzfaktoren und können somit zur Pathogenität von *H. p.* beitragen. Die Kulturextrakte wurden nicht nur auf Eschenblätter und -samen getestet, sondern auch an anderen Organismen, die schneller und einfacher zu handhaben wären, und zu vergleichbaren Ergebnisse führten.

4.8.2.1 Agardiffusionsassay mit *Chlorella fusca*

C. fusca stellt einen guten Testorganismus dar, um die in den Pilzkulturextrakten enthaltenen Sekundärmetabolite auf ihre algizide Wirksamkeit zu überprüfen. Der Test gibt auch Hinweise auf mögliche Herbizide Metabolite im Kulturextrakt. In diesem Versuchsansatz (Kap. 3.15.1) sollte untersucht werden, ob sich die Extrakte und damit Isolate in ihrer Aktivität unterscheiden, um eine Auswahl der an den Pflanzen zu testenden Stämme zu erleichtern. Später soll zudem überprüft werden, inwieweit die Ergebnisse des Algentests, den an Eschensämlingen durchgeführten Infektionsversuchen entsprechen.

Die Abbildungen 4.31 und 4.32 zeigen Assays von zwei unterschiedlichen Isolaten. Dabei wurde auf das linke Testblättchen jeweils der Biomalz-Kulturextrakt und auf das rechte der Dinkel-Gerste-Kulturextrakt aufgetragen. Während es durch den Stamm C 429 (Abb. 4.32) zu keiner Wachstumshemmung der Alge kam, wurde beim Stamm C 444 sowohl beim BM-Kulturextrakt als auch beim DiGe-Extrakt eine Beeinträchtigung des Wachstums um das Antibiotika- Testblättchen beobachtet (Abb. 4.31). Dabei bildete sich zudem beim DiGe-Kulturextrakt, als einzigem von allen getesteten Extrakten (Tab. 4.5), ein totaler Hemmhof aus, in dem es zu gar keiner Vermehrung der Alge kam.



Abbildung 4.31: Extrakte von C 444 besprüht mit einer Suspension aus sterilem Wasser und *Chlorella fusca*. Linkes Antibiotika-Blättchen: BM-Extrakt, rechtes: DiGe-Extrakt. Rechts Hemmhof um Blättchen, um links Blättchen geringe Wachstumshemmung. Foto C. Junker



Abbildung 4.32: Extrakte von C 429 besprüht mit einer Suspension aus sterilem Wasser und *Chlorella fusca*. Linkes Antibiotika-Blättchen: BM-Extrakt, rechtes: DiGe-Extrakt. Keine Hemmhofbildung oder Wachstumshemmung um die Blättchen. Foto C. Junker

Allgemein wurden durch DiGe-Kulturextrakte, fast dreimal so viele Hemmungen des Wachstums beobachtet, wie durch Extrakte gewonnen von den Pilzen, die auf Biomalz-Agar wuchsen (Tab. 4.5). Die Kulturextrakte der Isolate C 415, C 429, C 448, C 454, C 472, C 492 und C 502 hatten keinen Einfluss auf das Algenwachstum. Allerdings stellen auch die gemessenen partiellen Wachstumshemmungen (PH) von PH 6 und 7mm bei den anderen Stämmen einen relativ geringen Wert dar, da allein das AB-Testblättchen einen Radius von 4,5 mm hat und somit die Hemmwirkung nur 1,5 bis 2,5 mm vom Rand des Blättchens beträgt. Somit hatten nur die Extrakte C 444 DiGe (totale und partielle Hemmung), C 489 BM, C 502 DiGe und C509 BM und DiGe einen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum von *C. fusca*.

Tabelle 4.5: Pilzkulturextrakte verschiedener Stämme von *H. pseudoalbidus* kultiviert auf Biomalzagar (BM) und Dinkel-Gerste-Medium (DiGe), getestet in einem Agardiffusionsassay auf CP- Medium gegen *Chlorella fusca*. Hemmhofradius wurde von der Mitte des Blättchens in mm gemessen. Keine Wachstumsbeeinträchtigung = 0, partielle Hemmung = PH , d.h. etwas Wachstum innerhalb des Hemmhofs und totale Hemmung = kein Wachstum innerhalb des Hemmhof, rot = gute Hemmung

Stamm	Medium	Hemmung [mm]	Stamm	Medium	Hemmung [mm]
C 403	BM	0	C 448	BM	0
	DiGe	PH 6		DiGe	0
C 411	BM	0	C 454	BM	0
	DiGe	PH7		DiGe	0
C 415	BM	0	C 468	BM	PH 7
	DiGe	0		DiGe	PH 7
C 421	BM	0	C 472	BM	0
	DiGe	PH 6		DiGe	0
C 428	BM	0	C 480	BM	0
	DiGe	PH7		DiGe	PH 7
C 429	BM	0	C 489	BM	PH 10
	DiGe	0		DiGe	PH 6
C 434	BM	0	C 492	BM	0
	DiGe	PH 6		DiGe	0
C 442	BM	0	C 502	BM	0
	DiGe	PH 7		DiGe	0
C 444	BM	PH 7	C 509	BM	PH 8
	DiGe	8 + PH 3		DiGe	PH 8
Kontrolle MeOH/Ac		0	Kontrolle Medium	BM	0
				DiGe	0

4.8.2.2 Keimungstest mit *Agrostis stolonifera*

Im Keimungstest mit dem Gras *Agrostis stolonifera* wurde überprüft, ob die Pilzkulturextrakte das Auskeimen der Samen verhindern und ob es Parallelen zu *in vitro* Versuchen mit Kulturextrakt und *in planta* Versuchen nach Inokulation mit *F. e.* geben würde. Kulturextrakte von allen der 18 getesteten Extrakte hemmten die Keimung um mindestens 40%. Nach Auswertung der 96-Well-Platte (Abb. 4.33) gab es einzig bei den Biomalz-Extrakten bei 9 der 18 getesteten Stämme (Tab. 4.6) eine totale Hemmung der Samenkeimung (Keimungsrate 0%).

Zudem gab es bei einigen Stämmen starke Unterschiede in der Hemmwirkung zwischen dem BM- und dem DiGe-Extrakt. So keimten immerhin 38% der Samen mit dem DiGe-Kulturextrakt von C 468, aber 0% mit dem BM-Kulturextrakt. Am geringsten war der Einfluss des Dinkel-Gerste-Extraktes des Isolates C 502 mit 40% Auskeimung im Vergleich zur Kontrolle. Aber auch hier gibt es einen großen Unterschied zum Biomalz-Kulturextrakt, bei dem 92% der Samen nicht auskeimten.

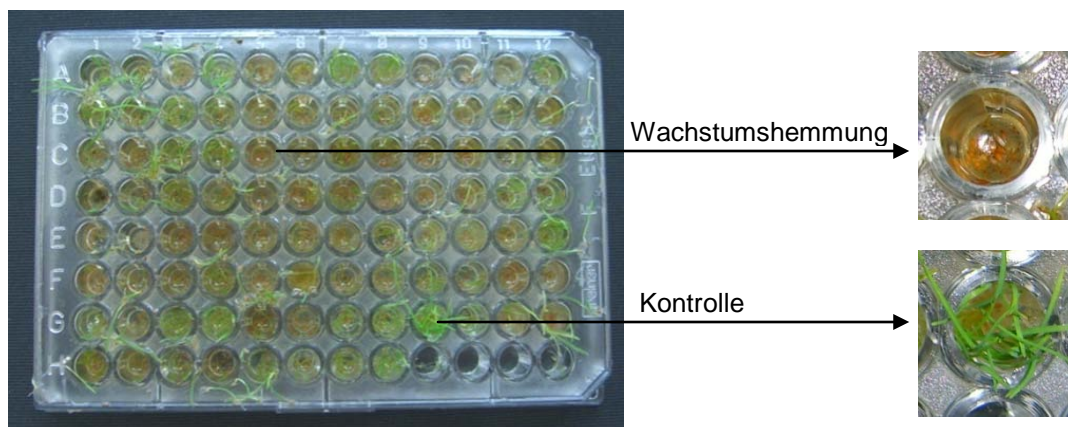


Abbildung 4.33: 96-Well-Platte mit 30 Samen von *A. stolonifera* pro Well, 250 µL Gamborg's B5-Lösung und 9 µL des Extraktes (1 Parallele). Pro Stamm wurden 2 Wells mit dem Bio-Extrakt und 2 Wells mit dem DiGe-Extrakt versehen (Doppelansatz). Die Kontrolle befand sich (rechts unten vergrößerte Abbildung) im unteren rechten Bereich der Platte. Die obere rechte Vergrößerung zeigt eine Hemmung der Samenkeimung. Foto C. Junker

Tabelle 4.6: Pilzkulturextrakte verschiedener Stämme von *H. p.* kultiviert auf Biomalzagar (BM) und Dinkel-Gerste-Medium (DiGe) getestet in einem Keimungstest in einer 96- Well- Platte gegen *Agrostis stolonifera*. Anzahl der ausgekeimten Samen der Kontrolle wurde mit 100% als Referenz angesetzt.

Stamm	Medium	Keimungs- rate [%]	Stamm	Medium	Keimungs- rate [%]
C 403	BM	10	C 448	BM	0
	DiGe	28		DiGe	23
C 411	BM	3	C 454	BM	3
	DiGe	5		DiGe	20
C 415	BM	5	C 468	BM	0
	DiGe	13		DiGe	38
C 421	BM	3	C 472	BM	33
	DiGe	28		DiGe	20
C 428	BM	0	C 480	BM	0
	DiGe	20		DiGe	3
C 429	BM	28	C 489	BM	0
	DiGe	35		DiGe	8
C 434	BM	0	C 492	BM	0
	DiGe	23		DiGe	20
C 442	BM	15	C 502	BM	8
	DiGe	28		DiGe	40
C 444	BM	0	C 509	BM	0
	DiGe	5		DiGe	13

4.8.2.3 Blattsegmenttest

Für den Blattsegmenttest wurden die Extrakte direkt auf die frisch gesammelten Eschenblätter aufgetragen (Kap. 3.15.3). Die Schädigung infolge der Inkubation mit dem Extrakt, wurde in Form von braunen Verfärbungen, einem Absterben des Blattgewebes (Nekrosen), am Auftragungsort sichtbar (Abb. 4.34). Hatte der Extrakt keinerlei Auswirkungen, so blieb das Blatt, auch nach verlängerter Inkubation von bis zu zwei Wochen, unverändert (Abb. 4.35).



Abbildung 4.34: Ein Eschenblatt auf feuchtem Filterpapier nach Auftragung des Extraktes BM C 509. Zu sehen ist eine flächige Verbräunung des Blattes auf der linken und rechten Seite. Foto C.



Abbildung 4.35: Ein Eschenblatt auf feuchtem Filterpapier nach Auftragung des Extraktes BM C 472. Es ist kaum eine Schädigung zu erkennen. Foto C. Junker

Wenig bis keine Schädigungen wurden durch die Kulturextrakte von 8 der 18 Stämme verursacht (Tab. 4.7). Es kam weder durch Auftragung der BM- noch der DiGe-Kulturextrakte von C 472 (Abb. 4.35) und C 502 zu erkennbaren Schäden. Am aggressivsten waren die Extrakte, sowohl DiGe als auch BM, der Stämme C 444, C 492 und C 509 (Abb. 4.34), bei denen es zu dunklen Verbräunungen des Blattes, auch weit entfernt des Auftragsortes, kam. Bei den Stämmen C 442 und C 468 wurden große Unterschiede in der Aktivität der BM- und DiGe-Extrakte festgestellt. Während die DiGe-Extrakte den Blättern nicht schadeten, wurde bei der Inkubation mit den BM-Kulturextrakten eine intensive dunkelbraune Verfärbung sichtbar. Umgekehrt stellte es sich bei den Extrakten von C 428 dar. Während der BM-Extrakt nur vereinzelte braune Spots auf den Blättern verursachte, kam es infolge des DiGe-Extraktes zu einer großflächigen Verbräunung der Blattoberfläche.

Tabelle 4.7: Pilzkulturextrakte verschiedener Stämme von *H. pseudoalbidus* gewonnen von Kulturen auf Biomalzagar (BM) und Dinkel-Gerste-Medium (DiGe) getestet auf Blättern von *Fraxinus excelsior*. Schädigungsgrad in Prozent d.h. Anteil Nekrosen auf den Blättern. Bei DiGe: - keine Schädigung, + wenige Nekrosen, ++ großflächige Nekrosen. gelb markiert = hohe Schädigung

Stamm	Medium	Schädigungs-grad [%]	Stamm	Medium	Schädigungs-grad [%]
C 403	BM	9,9	C 448	BM	3,9
	DiGe	+		DiGe	+
C 411	BM	6,7	C 454	BM	11,3
	DiGe	+		DiGe	+
C 415	BM	9,3	C 468	BM	12,6
	DiGe	+		DiGe	-
C 421	BM	5,7	C 472	BM	5,5
	DiGe	+		DiGe	-
C 428	BM	6,7	C 480	BM	9,3
	DiGe	++		DiGe	++
C 429	BM	5,8	C 489	BM	16,5
	DiGe	+		DiGe	++
C 434	BM	9,2	C 492	BM	17,0
	DiGe	+		DiGe	++
C 442	BM	8,1	C 502	BM	5,9
	DiGe	-		DiGe	-
C 444	BM	13,8	C 509	BM	18,8
	DiGe	++		DiGe	++
Kontrolle MeOH/Ac		0,6	Kontrolle Extrakte	BM	-
				DiGe	-

Um zu überprüfen, ob auch Stämme von *H. albidus* Nekrosen auf den Blättern der Esche hervorrufen, wurden hiervon ebenfalls Kulturextrakte von den Isolaten

090812.3a, Car1, Car5, Car6 und Car7 hergestellt und getestet und erneut mit Extrakten von *H. p.* vergleichen (Abb. 4.36, rechte Bilder). Die Extrakte von *H. a.* zeigten allesamt keinerlei Auswirkungen auf die Blätter (Abb. 4.36, linke Bilder).



Abbildung 4.36: Blattsegmenttest von *Fraxinus excelsior* benetzt mit 25 µl Pilzkulturextrakt (gelöst in MeOH/Ac, c= 40mg/ml) pro Blatt. Linke Aufnahmen zeigen Inkubation mit Pilzkulturextrakt 090812.3a von *H. albidus* (*H. a.*) und rechte Aufnahmen mit Pilzkulturextrakt C 489 von *H. pseudoalbidus*. Mittig wurde jeweils ein Blatt vergrößert dargestellt. Inkubation auf feuchtem Filterpapier in Petrischalen für 1 Woche bei 20 °C und 8 h Licht. Fotos C. Junker

4.8.2.4 Auskeimtest Eschensamen

Ein weiterer Test bei dem die Kulturextrakte der Isolate auf das Vorhandensein potentieller Virulenzfaktoren hin untersucht werden sollten, war ein Auskeimungstest, ähnlich dem Agrostistest (Kap. 3.15.2), bei dem es darum ging zu überprüfen, inwieweit im Extrakt enthaltene Substanzen die Samen am Auskeimen hindern. Hierfür wurden Eschensamen verwendet, wenn auch aufgrund der Größe der einzelnen Samen der Stichprobenumfang geringer war. Dafür wurden die Samen wie beschrieben vorbehandelt (Kap. 3.14). Die Anzahl der ausgekeimten Samen der Kontrollen wurden mit 100% gleichgesetzt und somit die Auskeimrate der Samen auf Medium mit zugesetztem Extrakt im Vergleich dazu berechnet. Wie im Balkendiagramm (Abb. 4.37) dargestellt wird es deutlich, dass die Auswirkung der Extrakte auf die Keimung der Eschensamen sehr unterschiedlich war. Weniger als 5% der Samen konnten in Gegenwart der Extrakte C 403 und C 489 auskeimen, womit es sich um die stärkste Hemmung in diesem Test handelt. Vergleichsweise mehr Samen entwickelten sich in Anwesenheit der Extrakte C 411 bis C 472, wobei hier im Schnitt die Auskeimrate immer noch 70% unter der Kontrolle lag. Die Präsenz der Extrakte EL 120 und die des Isolates von *H. albidus*, 090812.3a, hatten die geringste Auswirkung auf das Auskeimen. Immerhin noch 60-70% der Samen entwickelten Sprosse und Keimblätter, obwohl die Extrakte C 492 und C 502 im Medium gelöst waren.

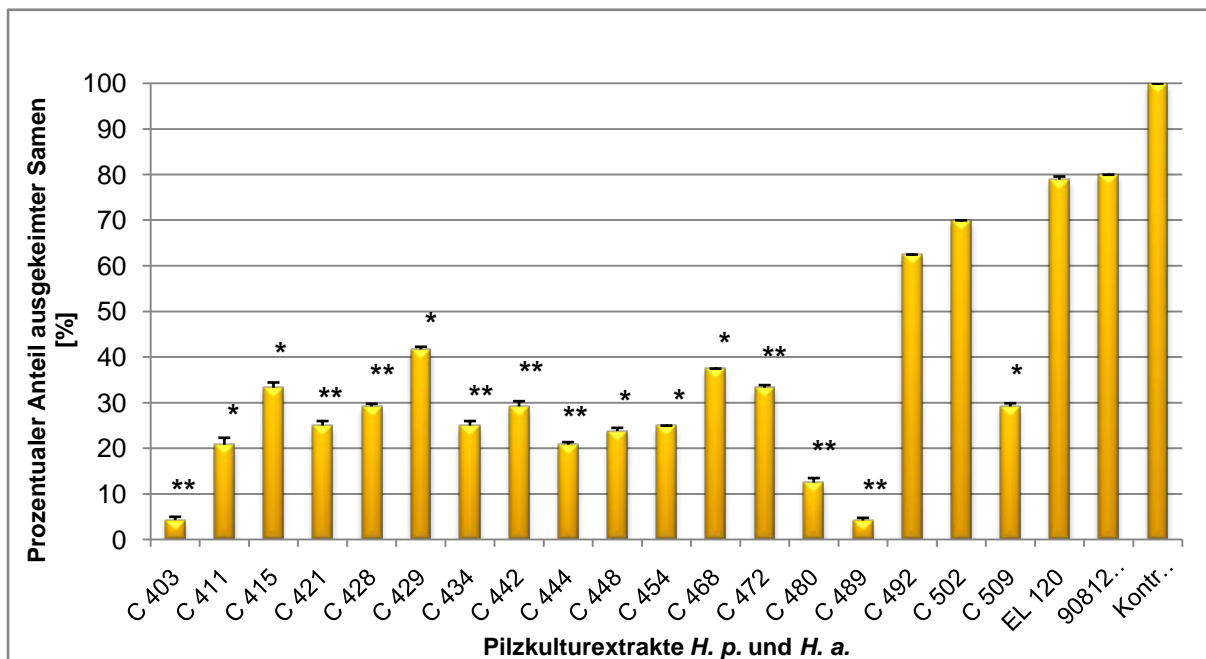


Abbildung 4.37: Auskeimtest mit Pilzkulturextrakte verschiedener Stämme von *H. p.*, sowie *H. a.* 090812.3a, getestet in H_{10} -Agar mit Eschensamen. Konzentration des Extrakts im Medium = [2g/l]. Die Anzahl ausgekeimter Samen der Kontrolle wurde 100% gesetzt. Inkubation der Samen für 14 d bei 20 °C und 8 h Licht (800x10 Lux). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Die Abbildung 4.38 veranschaulicht die dargestellten Ergebnisse. Waren Kotyledonen und ein Sprossansatz sichtbar, so galten die Samen als gekeimt. Zwar haben sich in Gegenwart von Extrakt C 502 (Abb. 4.38, links), im Vergleich zu dem Extrakt von *H. a.* (090812.3a, Abb. 4.38, rechts), die Pflanzen scheinbar besser entwickelt, aber wertet man die Samen auf das gleichzeitige Vorhandensein von Spross und Kotyledonen (wenn auch erst im Ansatz) aus, so lag die Anzahl bei *H. albidus* höher.



Abbildung 4.38: Auskeimtest von Eschensamen mit Pilzkulturextrakten der Stämme C 502 (Links), C 403 (Mitte) von *H. p.* und 090812.3a von *H. a.* (Rechts) getestet auf H_{10} -Agar. Konzentration des Extrakts im Medium = [2g/L]. Inkubation der Samen für 14 d bei 20 °C und 8 h Licht (800x10 Lux). Fotos C. Junker

4.8.2.5 Auskeimtest Basilikumsamen

Analog zum Auskeimtest mit Eschensamen (Kap. 4.8.2.4) und Pilzkulturextrakten, wurden Samen von Basilikum mit den gleichen Extrakten, mit Ausnahme den von *H. albidus*, inkubiert. Diese Studien sollen zeigen, inwiefern Basilikum eine adäquate Pflanze anstelle der Eschensämlinge ist. Diese sollen, wenn möglich, durch die leichter und in einem größeren Stichprobenumfang kultivierbaren Basilikumsämlinge ersetzt werden.

Tabelle 4.8: Auskeimtest mit Pilzkulturextrakte verschiedener Stämme von *H. p.* getestet in BM-Agar mit Basilikumsamen. Konzentration des Extrakts im Medium = [1,25 g/l]. Die Anzahl ausgekeimter Samen der Kontrolle wurde 100% gesetzt. Inkubation der Samen für 14 d bei 20 °C und 8 h Licht (800x10 Lux). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Kulturextrakt	Auskeimrate der Samen [%]
C 403	80
C 411	0 **
C 415	0 **
C 421	0 **
C 428	0 **
C 429	100 **
C 434	0 **
C 442	0 **
C 444	0 **
C 448	0 **
C 454	0 **
C 468	10 **
C 472	60
C 480	0 **
C 489	0 **
C 492	5 *
C 502	85 *
C 509	0 *
EL 120	80









Tabelle 4.8 zeigt, dass die Keimung der Samen durch 12 der 19 getesteten Extrakte zu 100% gehemmt wurde. Einzig die Extrakte C 403, C 429, C 472, C 502 und EL 120 ließen eine moderate bis sehr gute Keimung zu. Die Extrakte C 468 und C 492 hingegen inhibierten die Entwicklung der Samen sehr stark.

4.8.3 Infektionen von Eschensämlingen

Eine weitere Untersuchung zur Pathogenität der Isolate für die Wirtspflanze, neben dem Blattsegmenttest und Samenauskeimtest, ist die Infektion von axenisch kultivierten Eschensämlingen. Nach der Schnellanzucht der Sämlinge (Kap. 3. 14)

wurden diese mit Myzel von 12 ausgewählten Isolaten von *H. pseudoalbidus* sowie mit einem Isolat von *H. albidus* (Tab. 4.9) infiziert (Kap. 3.15.5) und nach sechs Wochen äußerlich auf Schädigung von Wurzeln, Stamm und Blätter bonitiert und mit den Kontrollpflanzen verglichen. Alle 13 Isolate haben die Sämlinge erfolgreich infiziert. Mit Ausnahme vom Isolat C502 führten die Infektionen zu mehr Krankheitsymptomen als in den Kontrollen (Tab. 4.9 und 4.10). Die Kontrollpflanzen wiesen grüne Blätter, einen stabilen Spross und viele verzweigte Wurzeln auf. Trotz fehlender Inokulation mit einem Pilz, kam es auch hier sehr vereinzelt zur Ausbildung kleiner Chlorosen, etwa am Blattrand oder Blattspitze. Zumeist waren die Sämlinge aber in Anbetracht des mit der Zeit beengten Lebensraumes und sich reduzierender Nährstoffe gut entwickelt. Die Infektion mit C 489 wirkte sich am negativsten auf die Gesundheit der Sämlinge aus. Über 70% der Pflanzen hatten stark nekrotische Laubblätter, bis hin zur Welke und Abwurf derselbigen (Tab. 4.9). Dies wirkte sich auch auf das Längenwachstum aus, welches stark eingeschränkt war. Auch Pflanzen, die mit dem Isolat C 492 infiziert waren, hatten ein deutlich verringertes Wachstum (Tab. 4.9 und 4.10). Sie erreichten nicht die Größe der gleichaltrigen Kontrollpflanzen, was nicht zuletzt der Schädigung der Pflanze in Form von welken, chlorotisierten und vitalitätslosen Blättern geschuldet war. Die Infektionen mit Stämmen wie C 403, C 428, C 444 oder C 509 verliefen weniger folgenreich. Etwa ein Viertel bis ein Drittel der Sämlinge wiesen Symptome wie welke Blattspitzen, vereinzelt Nekrosen oder Chlorosen an den Blatträndern oder reduzierte Laubblattentwicklung auf. Nur selten kam es zum Blattabfall, wie im Beispiel von Infektionen mit C 444 zu erkennen (Tab. 4.9). In ähnlicher Weise verlief die Infektion mit den als avirulent geltenden *H. albidus* Stamm 090812.3a. Wenn auch gleich die Belaubung der Sämlinge, sowie die Vitalität der Blätter und des Sprosses denen der Kontrollen glichen, so zeigten einzelne Blätter, vor allem Chlorosen in Form zahlreicher Spots, oder kleinere Welken am Blattrand. In einem Fall kam es sogar zu Welke der Blätter, die später in einem teilweisen Blattabfall resultierte. Geringe bis keine Krankheitssymptome hatten Sämlinge, infiziert mit C 502. Diese Pflänzchen zeichnete ein z.T. enormes Längenwachstum aus, wie auch in der Abbildung zu erkennen (Tab. 4.9), was wiederum, aufgrund der begrenzten Höhe des Glases, zu einer Krümmung des Sprosses führte. Wie auch die Kontrollen, waren diese Sämlinge entsprechend ihres Alters gut belaubt und wiesen ein robustes Gesamterscheinungsbild auf.

Tabelle 4.9: Infektion von axenisch kultivierten Eschensämlingen mit den *H. p.*-Stämmen C 403, C 444, C 489, C 492, C 502, El 120 und *H. albidus* 090812.3a auf H₁₀-Medium 6 Wochen nach der Inokulation. Fotos C. Junker

Kontrolle	Infektion C 502	Infektion C 489	Infektion 090812.3a
			
Infektion C444	Infektion C 492	Infektion C 403	Infektion EL 120
			

Um zu überprüfen, ob die infizierten Pflanzen auch von den Pilzen besiedelt wurden, mussten von diesen Pflanzen Segmente ausgelegt werden. Dafür wurden die Pflanzen unter sterilen Bedingungen wieder aus den Gläsern entfernt und oberflächensterilisiert (Kap. 3.17). Getrennt nach Wurzel, Spross und Blätter wurden die Pflanzenteile auf KM-Agar ausgelegt und bei RT kultiviert. Nach 1-2 Woche konnten grundsätzlich alle Stämme von *H. pseudoalbidus* wieder aus den Sämlingen isoliert werden, nur nicht immer aus demselben Abschnitt (Tab. 4.10). So wurden die

Isolate zu 83% aus den Wurzeln, zu 50% aus dem Spross und in nur einem Fall (C 509) aus den Blättern isoliert. Nicht aus den Pflanzen isoliert werden konnte das Isolat von *H. albidus*.

Tabelle 4.10: *in vitro* Infektion von Eschensämlingen mit Myzel von Isolaten von *H. pseudoalbidus* und einem Stamm von *H. albidus*. Anteil der Pflanzen mit Krankheitssymptomen in Prozent. • Isolat konnte aus dem Pflanzenabschnitt reisoliert werden. n=10-25

Stammnummer	Taxon	Anteil Pflanzen mit Krankheitssymptomen [%]	Reisolation		
			Blatt	Spross	Wurzel
C 403	<i>H. pseudoalbidus</i>	28		•	•
C 411	<i>H. pseudoalbidus</i>	21			•
C 421	<i>H. pseudoalbidus</i>	20			•
C 428	<i>H. pseudoalbidus</i>	30		•	•
C 429	<i>H. pseudoalbidus</i>	20			•
C 444	<i>H. pseudoalbidus</i>	30		•	•
C 472	<i>H. pseudoalbidus</i>	36			•
C 489	<i>H. pseudoalbidus</i>	73		•	
C 492	<i>H. pseudoalbidus</i>	60		•	•
C 502	<i>H. pseudoalbidus</i>	10			•
C 509	<i>H. pseudoalbidus</i>	27	•	•	
EL 120	<i>H. pseudoalbidus</i>	18			•
090812.a	<i>H. albidus</i>	26			
Kontrolle		10			

Auf die Darstellung andere Boniturergebnisse, wie der Länge von Spross und Wurzel, die Anzahl der Blätter oder dem Trockengewicht der einzelnen Pflanzenabschnitte, wurde an dieser Stelle verzichtet, da die Daten keine Rückschlüsse auf die unterschiedliche Virulenz der Isolate erlaubten.

4.8.4 Histologie axenisch infizierter Eschensämlinge

Aufgrund des zum Teil hohen präparativen und auch zeitlichen Aufwandes bei der Probenvorbereitung, konnten nicht alle Infektionsstudien auch mikroskopisch ausgewertet werden, obwohl diese Art der Untersuchung gute und vor allem eindrucksvolle Erkenntnisse zur Art und Weise der Infektion liefert. Bei der Hellfeldmikroskopie werden von den eingebetteten Pflanzenproben, wie beschrieben (Kap. 3.18), Dünnschnitte angefertigt und mit Farbstoffen kontrastiert. Abbildung 4.39 zeigt eine Übersichtsaufnahme und Abbildung 4.40 eine Detailaufnahme eines Längsschnittes einer Eschenwurzel, nach der Infektion einer axenischen Esche mit C 421. Die Pfeile zeigen, dass Hyphen in den Pflanzenzellen der Wurzeln wachsen und diese somit erfolgreich besiedeln konnten. Da die Sämlinge zuvor axenisch kultiviert wurden ist es klar, dass die Hyphen von *H. p.* stammen müssen. Dagegen

sind keine Hyphen interzellulär erkennbar, was die Fähigkeit des Pilzes in den Zellzwischenraum zu wachsen nicht ausschließt. Aufgrund der gleichermaßen intensiv gefärbten pflanzlichen Strukturen ist deshalb hierzu keine eindeutige Aussage möglich.

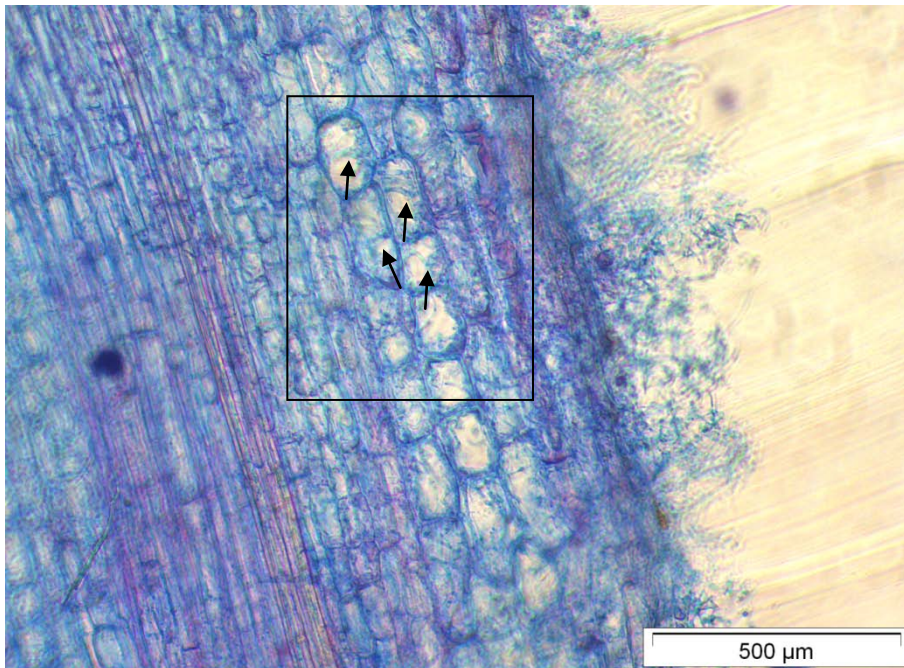


Abbildung 4.39: Übersichtsaufnahme: Längsschnitt durch eine Wurzel von einer axenisch kultivierten Esche infiziert mit dem Stamm C 421 und angefärbt mit Trypanblau. Der schwarze Rahmen zeigt den in Abbildung 4.40 vergrößerten Ausschnitt. Die Pfeile zeigen septierte Hyphen des Stammes C 421 in den Pflanzenzellen. Foto C. Junker

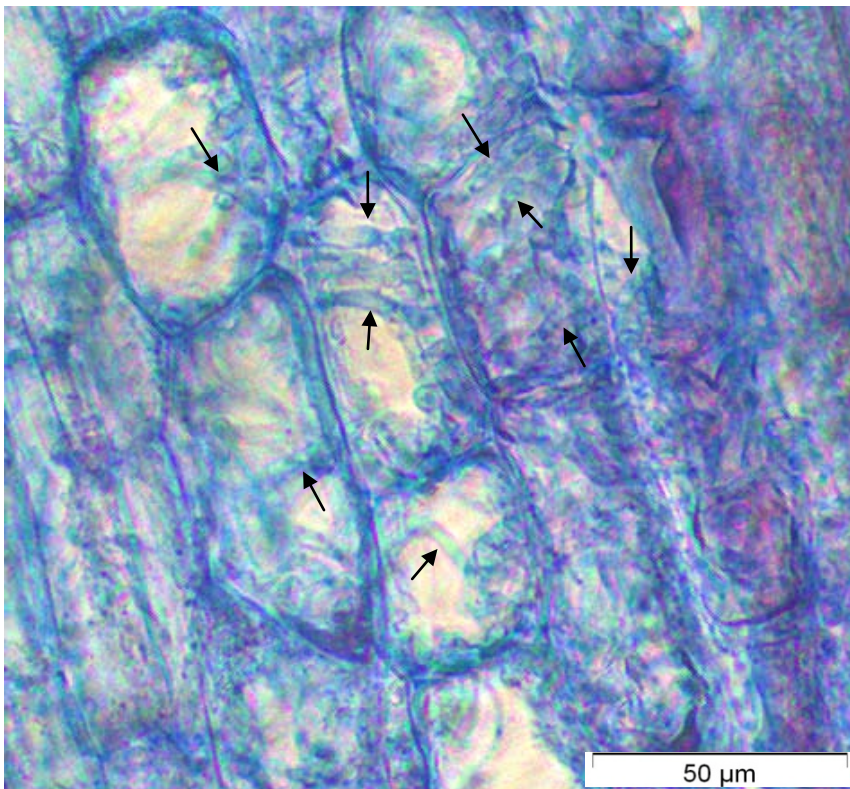


Abbildung 4.40: Detailaufnahme: Längsschnitt durch eine Wurzel von einer axenisch kultivierten Esche infiziert mit dem Stamm C 421 und angefärbt mit Trypanblau. Die Pfeile zeigen septierte Hyphen des Stammes C 421 in den Pflanzenzellen. Foto C. Junker

4.9 Infektionen von Basilikumsämlingen

Analog zur Infektion von Eschensämlingen (Kap. 4.8.3) wurden junge Basilikumpflanzen axenisch kultiviert (Kap. 3.13.6.1) und im Alter von ca. 2 Wochen mit Myzelstücken von *H. p.* inokuliert (Kap. 3.13.6.3). Dies sollte zeigen, ob die Resultate der Infektion an Basilikumpflanzen mit den Ergebnissen der Infektion an Eschen korrelieren und diese als schnellwachsende Testpflanze geeignet seien.

Verglichen mit den Kontrollen (Abb. 4.41 und Tab. 4.11) wiesen die infizierten Sämlinge, mit Ausnahme der Infektionen mit C 489, C 502 und EL 120, mittel bis stark chlorotische Keimblätter auf. Zudem hatten, bis auf die Infektion mit C 502, alle Sämlinge verbräunte Sprosse, die infolge dessen z.T. sehr dünn und wenig stabil waren (Tab. 4.11). Eine Ausnahme bildeten die Sämlinge, welche mit C 502 kultiviert wurden. Sie hatten als einzige weder Chlorosen an den Blättern, noch waren die Sprosse nekrotisiert. Ferner hatte der Pilzstamm einen positiven Einfluss auf das Längenwachstum der Sprosse, wie gut in der Abbildung zu sehen ist.

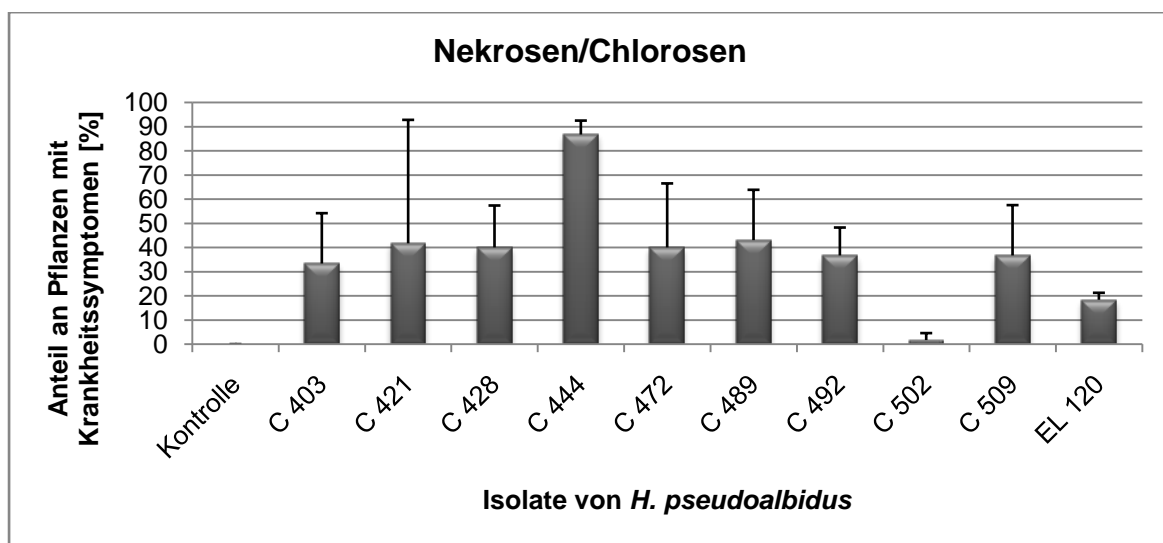






















Abbildung 4.41: Chlorosen- und Nekrosenbildung von axenisch kultivierten Basilikumsämlingen infiziert mit verschiedenen Stämmen von *H. p.*. Inokulationsdauer 6 Wochen auf BM-Agar bei 20 °C und 8 h Licht.

Krankheitssymptome wurden an Blättern und Sprossen diagnostiziert, die Wurzeln hatten aufgrund des braunen Mediums eine dunklere Färbung und konnten nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die Abbildungen in Tabelle 4.11 verdeutlichen den Unterschied in der Virulenz der Isolate. So zeigten einige Sämlinge nur Chlorosen an den Keimblättern (Bsp. C 403), andere hingegen wiesen zudem noch Nekrosen an Blättern und Spross auf (Bsp. C 421, C 428). Mit nur 2%

symptomatischer Pflanzen blieben die Sämlinge infiziert mit C 502 äußerlich fast unbeeinflusst.

Tabelle 4.11: Basilikumsämlinge axenisch kultiviert auf BM-Agar, 6 Wochen nach der Inokulation mit verschiedenen Isolaten von *H. p.* Jeweils linkes Bild ist eine Gesamtansicht mit einer Detailaufnahme rechts daneben. Fotos C. Junker

Kontrolle	Infektion mit C 472
	
	
Infektion mit C 403	Infektion mit C 489
	
	
Infektion mit C 421	Infektion mit C 502
	
	
Infektion mit C 428	Infektion mit C 509
	
	
Infektion mit C 444	Infektion mit EL 120
	
	

Trotz aufgetretener Krankheitssymptome konnten nicht alle Pilze wieder isoliert werden konnten (Tab. 4.12). Aus nur 64% der Infektionsansätze wurden die Pilze in den ausgelegten Pflanzensegmenten nachgewiesen. War die Reisolierung positiv, erfolgte diese überwiegend aus den Wurzeln der Pflanzen und nur zu 27% aus dem Spross.

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Reisolation aus mit Myzel von verschiedenen Stämmen von *H. p.* inokulierten Basilikumsämlingen. Die Infektionsdauer betrug 6 Wochen bei 20 °C und 8 h Licht. B=Blatt, S=Spross, W=Wurzel.

Pilzstamm	Reisolation			Pilzstamm	Reisolation		
	B	S	W		B	S	W
C 403				C 489			
C 421				C 492			
C 428		•	•	C 502			•
C 429			•	C 509		•	•
C 444			•	EL 120	•	•	
C 472	•		•	Kontrolle			

Zu den oben gezeigten Infektionen wurden weitere *H. p.*-Stämme auf ihre Virulenz in Basilikum getestet. Da diese aber nicht mehr in Infektionsstudien mit Eschensämlingen getestet werden konnten, würde ein Vergleich zur Wirtspflanze fehlen, weshalb sie an dieser Stelle weggelassen wurden.

4.10 *In vivo* Infektion von Eschen

Begleitend zu den Versuchen unter Laborbedingungen, bei denen mit sterilen Eschenpflanzen gearbeitet wurde, wurden ebenfalls Infektionen unterschiedlicher Art an jungen Eschenpflanzen im Gewächshaus durchgeführt. Diese wurden, wie die axenischen Eschensämlinge, mit Myzel von Agarkulturen von *H. p.* inokuliert.

Um die etwa 3 Monate alten Eschen im Gewächshaus zu inokulieren, wurde ein mit Myzel anhaftender Zahnstocher vorsichtig in das untere Drittel des Spross gesteckt (Kap. 3.16). Die Pflanzen wurden mit den Stämmen C 403, C 428, C 444, C 472 und C 502 inokuliert und für einen Monat weiter kultiviert.

Die Bonitur zeigte, dass die inokulierten Pflanzen sich nur wenig zu den Kontrollpflanzen unterschieden. Aufgrund von zusätzlichem Befall mit Eschenmehltau konnte ein eindeutiges Krankheitsbild, welches allein auf die Infektion mit den Isolaten zurückzuführen wäre, nicht mehr erkannt werden. Deshalb

erscheint eine Analyse des Versuchs an dieser Stelle nicht sinnvoll und wäre zudem nicht mit den *in vitro* Versuchen vergleichbar.

4.11 Pilzendophyten aus der Esche

Bereits im Jahr 2008 wurde Pflanzenmaterial von Eschen aus dem Gebiet Elm zur Isolierung womöglich interessanter endophytischer Pilze oberflächensterilisiert. Aus diesen damals zum Teil symptomfreien Eschenbäumen wurde eine Reihe von Pilzendophyten isoliert (Kap. 3.4). Schon bei dem erfolgreichen Versuch *H. pseudoalbidus* aus nekrotischem Pflanzenmaterial zu isolieren, konnten sozusagen als Nebenprodukt zu *H. p.*, Pilze aus anderen Gattungen, wie *Pleurocytophora*, *Phomopsis*, *Cryptosporiopsis*, *Microsphaeropsis*, *Phoma*, *Coniothyrium* und *Stagonospora*, isoliert werden. In Pflanzen oft nicht nur eine Pilzart, sondern eine Gemeinschaft mehrerer Arten anzutreffen, wovon viele von ihnen Endophyten sind. Endophyten koexistieren in ihrem Wirt, ohne sie krank zu machen, wobei einige von ihnen auch Mutualisten sind und das Wachstum des Wirtes verbessern bzw. durch ausgeschiedenen Metabolite Konkurrenten abwehren können. Diese Tatsachen gaben Anlass, diese Endophyten auf womöglich positiven Einflüssen auf die Esche und negativen auf *H. pseudoalbidus* zu untersuchen.

4.11.1 Dualkulturversuche Endophyt - *H. pseudoalbidus*

Aufgrund der Vielzahl der Endophyten sollten zunächst nur ein bis zwei Vertreter pro Pilzgattung (Kap. 3.2, Tab.1) gegen als virulent eingestufte *H. p.*-Stämme auf ihre wachstumshemmende Wirkung getestet werden. Aufgrund eines Vortests, ebenfalls in Dualkultur, wurden dann die Endophyten 9938, 9939, 9942, 9943, 10049, 10059 und 10274 ausgewählt, da sie die besten hemmenden Eigenschaften zeigten. Im den Balkendiagrammen in Abbildung 4.42 sind die Mono- und Dualkulturen mit den *H. p.*-Stämme C 492 und C 489 dargestellt, welche gegen die sieben Endophyten getestet wurden. Der blau schattierte Balken kennzeichnet jeweils die Monokultur von *H. p.* und in grau dargestellt ist das Wachstum des Isolats in Gegenwart des jeweiligen Endophyten.

C 492, ein mittelschnell wachsender Stamm, konnte von allen Endophyten signifikant im Wachstum gehemmt werden. Die beste antagonistische Wirkung zeigte der Endophyt 10049, ein *Nodulisporium*, in dessen Gegenwart C 492 nur

noch 21% seiner Koloniegröße in Monokultur erreichte. C 489 ist ein im Vergleich schnell wachsendes Isolat in Kultur. Trotzdem bildete auch er im Mittel um 24% kleinere Kolonien. Im Gegensatz zu C 492 hatte der Endophyt 10049 bei C 489 keine inhibierende Wirkung, im Gegenteil, es kam sogar zu einer leichten Wachstumsförderung des Pathogens in dessen Gegenwart.

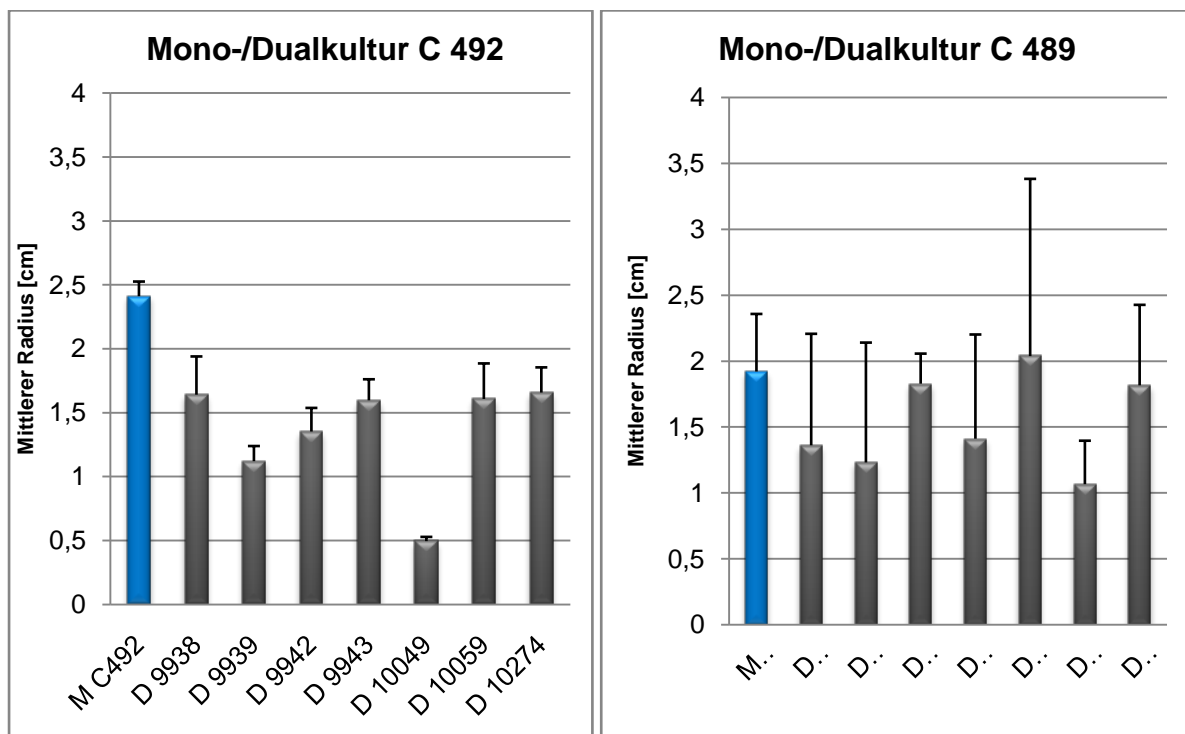


Abbildung 4.42: Mono-/Dualkultur von C 492 (links) und C 489 (rechts) mit unterschiedlichen Endophyten, isoliert aus der Esche. Ein Balken zeigt das mittlere Wachstum des Isolats von *H. p.* in Monokultur (M) (blau) und in Dualkultur (D) mit Endophyt (grau).

Am Beispiel des Endophyten 9939 (Abbildung 4.43) soll nochmal deutlich gemacht werden, wie unterschiedlich Endophyten das Wachstum der Isolate negativ beeinflussen und dass es sehr vom Isolat abhängt, in welchem Ausmaß dies möglich ist. In Dualkultur erreichte beispielsweise C 492 nur 42% der Größe der Monokultur. Auch das Wachstum von Isolat C 502 wurde durch den Endophyten mit über 50% in seinem Wachstum gehemmt.

Die Endophyten haben auch auf das Wachstum von EL 120 gut gehemmt. Hier erreichte der Pilz in Dualkultur mit 9939 nur 50% der Größe der Monokultur. Das Wachstum von C 509 dagegen ließ sich im Schnitt nur zu 20% am Wachstum in Dualkultur hemmen (nicht dargestellt).

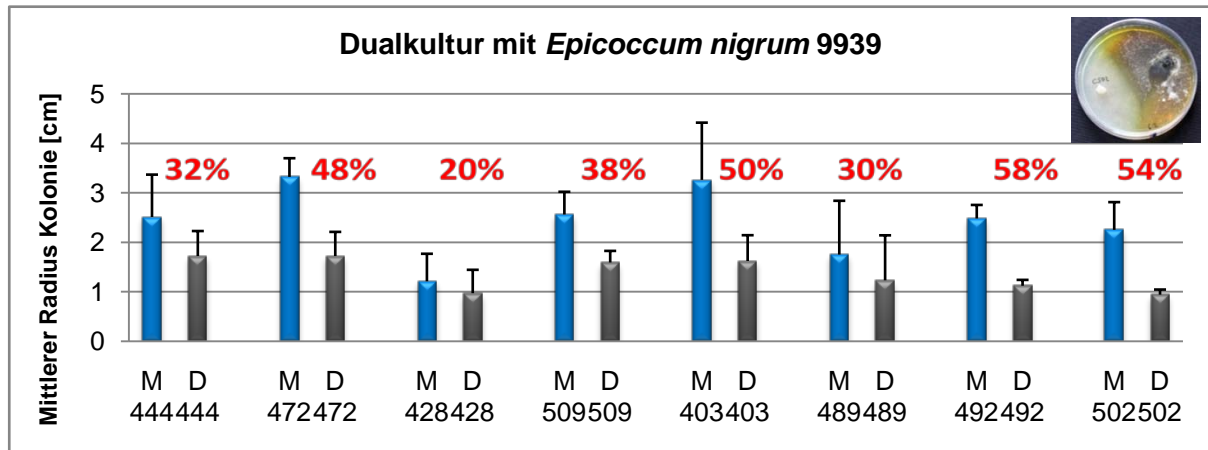


Abbildung 4.43: Dualkultur des Endophyten 9939 mit verschiedenen Isolat von *H. pseudoalbidus* auf KM-Agar. Kultivierung für 20 d bei RT. Der schwarze Balken zeigt den mittleren Radius der Kolonie in Monokultur (M) und der blaue Balken den mittleren Radius der Kolonie in Dualkultur (D). Die Prozentangaben geben die Wachstumshemmung der Isolate in Dualkultur an. Das Foto zeigt eine Dualkultur von C 502 (linke Kolonie) mit dem Endophyten (rechte Kolonie).

Tabelle 4.13 zeigt Ergebnisse der Dualkulturen, darunter neben den bereits als positiv gegen *H. p.* getesteten Endophyten weitere aus der Esche isolierte Endophyten. Dabei wird deutlich, dass auch *H. p.* in der Lage war das Wachstum der Endophyten negativ zu beeinflussen. Trotzdem lag die durchschnittliche Hemmleistung der Endophyten über denen der *H. p.* - Isolate. Die Isolate 10274 (*Cladosporium* sp.) und 10275 (*Mycelia sterile*) gelten wegen ihrer antagonistischen Wirkung gegen *H. p.* als besonders geeignet, da sie in der Lage waren, nicht nur das Wachstum des Pathogens zu inhibieren, sondern zusätzlich als einzige Endophyten in Dualkultur besseres Wachstum zeigten, als in Monokultur (beige unterlegt).

Tabelle 4.13: Pilzendophyten aus *Fraxinus excelsior*. Interaktionen der Endophyten aus *F. e.* mit *H. p.* in Dualkultur. dunkelrot unterlegt = besonders gute Hemmung gegen *H. p.*-Isolate; beige unterlegt = keine Hemmung des Endophyten durch *H. p.* und mehr Wachstum in Dualkultur als die Kontrolle.

Stamm Pilz-Endophyt	Taxon	durchschnittliche Hemmung von <i>H. p.</i> durch Endophyt [%]	durchschnittliche Hemmung des Endophyten durch <i>H. p.</i> [%]	Anzahl getesteter <i>H. p.</i> Isolate
9936	<i>Phomopsis</i> sp.	31.1	27.2	4
9938	<i>Phomopsis</i> sp.	28.3	19.4	8
9939	<i>Epicoccum nigrum</i>	41.3	17.5	8
9942	<i>Phoma</i> sp.	33.0	15.9	7
9943	<i>Phoma</i> sp.	29.6	21.7	8
9953	<i>Phoma</i> sp.	29.4	27.9	2
9961	<i>Phomopsis</i> sp.	35.0	31.0	3
9964	<i>Phomopsis</i> sp.	36.2	27.3	4
9967	<i>Phomopsis</i> sp.	36.7	26.4	3
10049	<i>Nodulisporium</i> sp.	31.2	20.1	7
10059	<i>Phoma</i> sp.	28.4	17.9	8
10062	<i>Phomopsis</i> sp.	22.1	10.8	5
10274	<i>Cladosporium</i> sp.	28.7	+ 12.3	6
10275	<i>Mycelia sterile</i>	18.9	+ 7.0	3
10290	<i>Acremonium</i> sp.	24.9	12.0	3

4.11.2 Dünnschichtchromatographie der Dualkulturen

In den Abbildungen 4.44 und 4.45 sind exemplarisch Dünnschichtchromatographien der Kulturextrakte von Dualkulturen von Endophyten und Isolaten von *H. p.* als auch zum Vergleich die Monokulturen dargestellt. Die Dünnschichtchromatogramme wurden bei verschiedenen Wellenlängen ausgewertet (Kap. 3.11.1) und zeigen, nachgezeichnet durch Umrandung mit Schwarz und Grün, die unter Tageslicht nicht sichtbaren Banden der einzelnen Kulturextrakte. Links auf der DC in Abb. 4.44 wurden Extrakte des Endophyten aus einer Monokultur aufgetragen, in diesem Beispiel 9938 (*Phomopsis* sp.) und daneben die Extrakte aus Dualkulturen mit diesem Endophyten und verschiedenen *H. p.*-Isolaten (gekennzeichnet mit einem Plus). Es wird deutlich, dass es diverse Banden gibt, die allen Extrakten gemein sind und Banden, welche nur bei einigen Dualkulturen vorkommen. So zeigt die mit einem gelben Pfeil markierte Reihe (366 nm), dass dieser Stoff in allen Extrakten der Dualkulturen einschließlich der Monokulturen (Abb. 4.45) vorkommt und damit nicht exklusiv in Mono-oder Dualkultur gebildet wurde. Da diese Bande sowohl bei dem Pathogen als auch dem Endophyten und der Mediumkontrolle (KM) zu finden ist, kann man von der Annahme ausgehen, dass es sich um einen aus dem Medium stammenden Stoff, wie ein Carotinoid, handelt. Eine Ausnahme bildet der Monokulturextrakt von EL 120, bei dem die Bande vermutlich zu schwach war, um mit dem Auge erkannt zu werden. Anders verhält es sich mit Banden gemessen bei 254 nm, markiert mit dunkel- (Rf-Werte 0,8) und hellgrünen (Rf-Wert 0,73) Pfeilen. Generell wurden sie nicht in den Dualkulturen von 9938 mit C 421, C 428 und C 472 gebildet, sind aber, zumindest was die Bande bei dem Rf-Wert 0,8 anbelangt, im Monokulturextrakt von EL 120 und die Bande mit dem Rf-Wert 0,73 in den Extrakten von C 421 und C 428 in Monokultur nachweisbar. Desweiteren wurde eine Bande identifiziert (Rf 0,67), die im Dualkulturextrakt nur bei den Stämmen C 509, C472 und C 403 auftritt (dunkelroter Pfeil), im Extrakt der Monokultur aber noch nicht vorkommt. Die in Dualkultur mit einem blauen Pfeil markierte Reihe, sichtbar bei 366 nm, ist wieder bei allen Extrakten zu finden, inklusive der Monokultur des Endophyten 9938, aber nicht beim Extrakt des Mediums. Das deutet darauf hin, dass diese Substanz vom Endophyten gebildet und auch noch in Dualkultur synthetisiert wurde. Im Allgemeinen konnten bei 7 der 11 Isolate von *H. p.* in Dualkultur durchschnittlich 26% weniger Banden detektiert werden. Der größte Unterschied wurde beim Kulturextrakt von C 421 sichtbar. Wurden in Monokultur noch 17 Substanzen bei

beiden Wellenlängen erfasst, so waren es Dualkultur mit 9938 nur noch 5 (blaue Umrandung). Hier kam es in Anwesenheit des Endophyten zu einer starken Reduktion der Sekundärstoffproduktion. Bei den Isolaten C 492 und C 497 verhielt es sich umgekehrt. Sie bildeten in Gegenwart von 9938 50% mehr Metabolite (rote Umrandung).

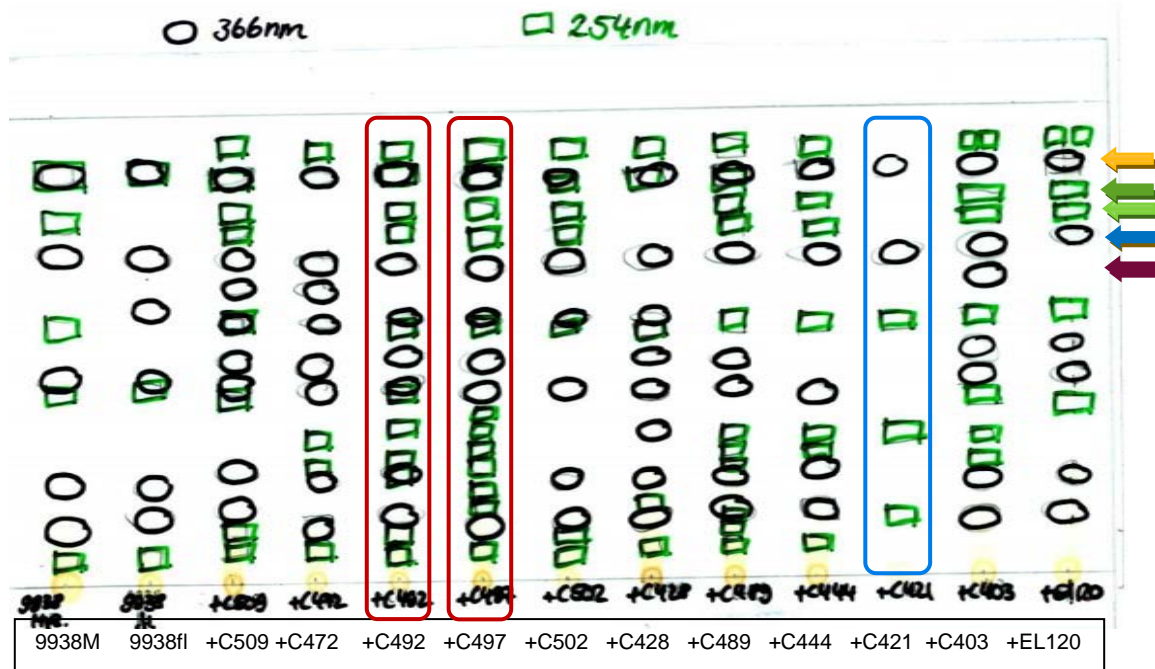


Abbildung 4.44: Dünnschichtchromatographie von Extrakten der Mono- und Dualkulturen des Endophyten 9938 (*Phomopsis* sp.) mit Isolaten von *H. p.*. Kultivierung auf KM-Agar, 20 Tage, RT, Dunkelheit). Auswertung unter UV-Licht. schwarze Umrandung=366 nm, grünen Umrandung= 254 nm, M= mit Myzel angeimpft, fl= mit Flüssigkultur inokuliert, + C... bedeutet Endophyt in Dualkultur mit dem jeweiligen *H. p.*-Stamm. Farbige Pfeile werden im Text erklärt.

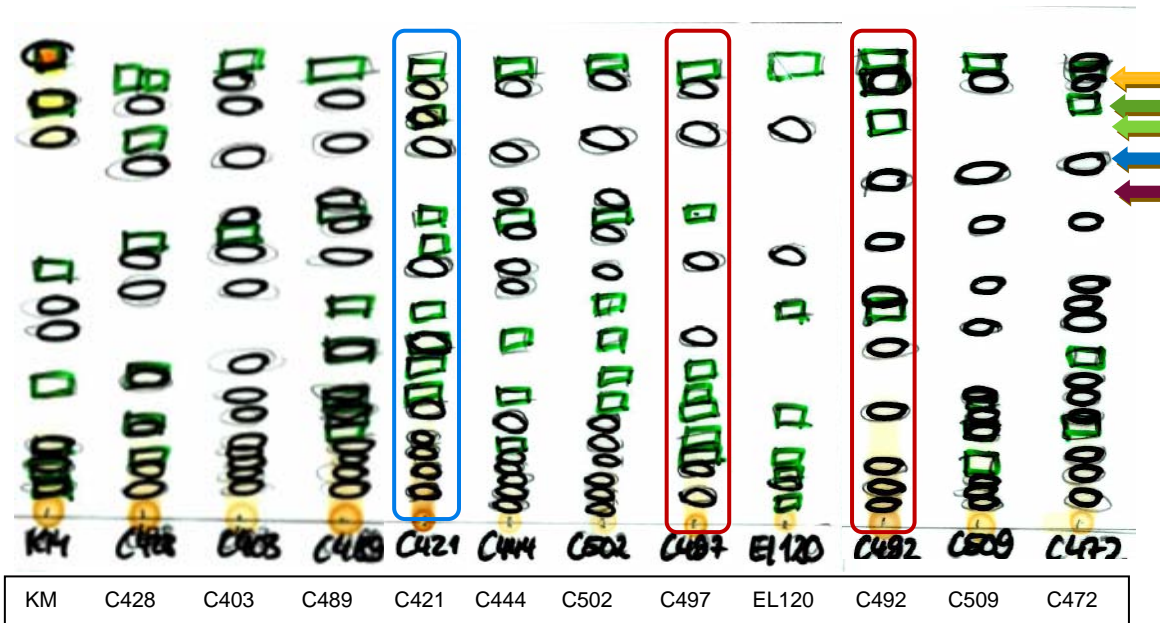


Abbildung 4.45: Dünnschichtchromatographie von Extrakten der Monokulturen von *H. p.*. Kultivierung auf KM-Agar, 20 Tage, RT, Dunkelheit). Auswertung unter UV-Licht. schwarze Umrandung=366 nm, grünen Umrandung= 254 nm.

4.11.3 Viridiolgehalt Monokultur gegenüber Dualkultur

Bereits in Kapitel 4.6 wurde über das Vorhandensein des Phytotoxins Viridiol in Kulturextrakte von Isolaten von *H. pseudoalbidus* berichtet. In einer weiteren Analyse sollte überprüft werden, inwieweit in Co-Kultur mit antagonistischen Pilzendophyten (Kap. 4.9.1) die Produktion dieser Substanz erhöht oder sogar verringert wird. Wie die Daten zeigen (Tab. 4.14), wurde kein Viridiol in Dualkulturen nachgewiesen, wo auch schon die Isolate in Monokultur keins produziert hatten, so bei den Stämmen C 403, C 472 und C 502. Anders verhält sich mit den *H. p.*-Isolate, die in Monokultur Viridiol produzierten. In zwei Fällen, C 411 und C 492, welche zum einen über 70 µg Viridiol pro mg Extrakt und zum anderen weniger als 1 µg sezernierten, wurde in Co-Kultur mit den Endophyten gar kein Viridiol mehr nachgewiesen. In den anderen Dualkulturen wurde Viridiol zumeist um ein vielfaches reduziert, oder war gleichermaßen nicht mehr detektierbar. So sank der Viridiolgehalt von 80,6 µg der Monokultur C 444 auf 0,31 µg in der Dualkultur mit 9938 und war somit 260fach geringer. Nur noch 1% der ursprünglichen Konzentration konnte in der Dualkultur von EL 120 mit dem Endophyten 9939 nachgewiesen werden, während in Kultur mit 9938 kein Nachweis mehr möglich war.

Tabelle 4.14: Viridiol in Kulturextrakte von verschiedenen Isolaten von *H. pseudoalbidus* vergleichend in Monokultur und Dualkultur mit den endophytischen Pilzen 9938 (*Phomopsis* sp.), 9939 (*Epicoccum nigrum*) und z.T. 9942 (*Phoma* sp.). - = kein Viridiol detektiert; ++ = hohe Konzentration gemessen, aber nicht quantifiziert, ()angegebener Wert stammt aus anderer Messung; + = Viridiol vorhanden, aber nicht quantifiziert.

Kulturextrakt Mono-/Dualkultur	µg Viridiol pro mg Extrakt	Kulturextrakt Mono-/Dualkultur	µg Viridiol pro mg Extrakt
C 403	-	C 489	0,02
+ 9938	-	+ 9938	-
+ 9939	-	+ 9939	0,01
C 411	77,2	C 492	0,55
+ 9938	-	+ 9938	-
+ 9939	-	+ 9939	-
C 421	++ (43,5)	+ 9942	-
+ 9938	0,22	C 502	-
+ 9939	-	+ 9938	-
C 428	2,33	+ 9939	-
+ 9938	-	C 509	24,9
+ 9939	+	+ 9938	-
C 444	80,6	+ 9939	0,91
+ 9938	0,31	+ 9942	0,41
+ 9939	2,68	EL 120	3,82
C 472	-	+ 9938	-
+ 9938	-	+ 9939	0,05
+ 9939	-		
+ 9942	-		

4.11.4. Inokulation von Endophyten in Eschensämlinge

Die antagonistische Wirkweise der Endophyten sollte auch auf das *in vitro* System Esche-Pathogen übertragen werden, um zu untersuchen, inwieweit es möglich wäre, Sämlinge mit einem Schutz vor dem Eindringen des Pathogens auszustatten. Dafür wurden Eschensämlinge axenisch angezogen (Kap. 3.14) und mit Myzelkulturen von *Phomopsis* sp. (9938), *Epicoccum nigrum* (9939) bzw. *Phoma* sp. (9942) inokuliert.

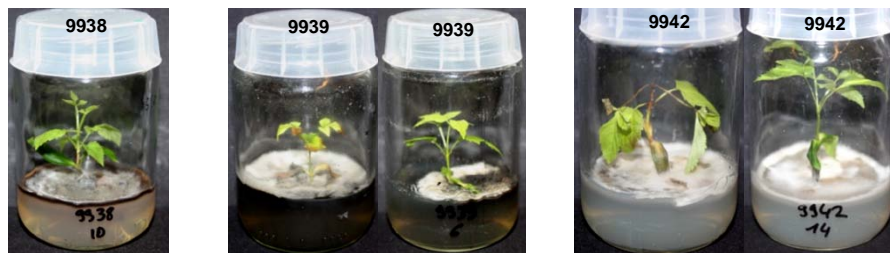


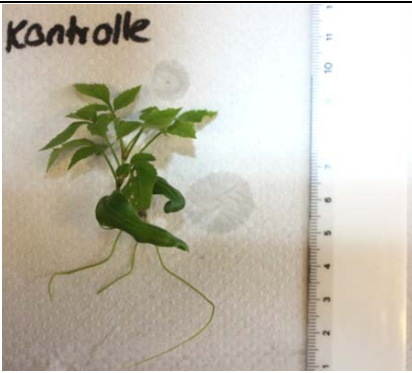

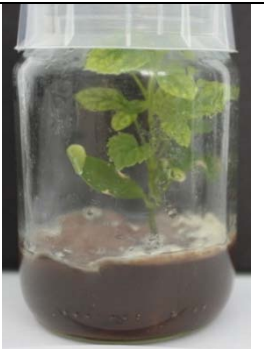


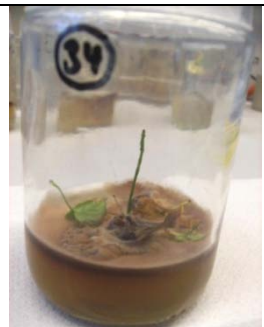






Abbildung 4.46: Axenische Eschensämlinge 4 Wochen nach der Inokulation mit Myzel von 9938 (links), 9939 (mittig) und 9942 (rechts) auf H₁₀-Medium, bei 20 °C und 8 h Licht (800x10 Lux). Fotos C. Junker

Schon nach der 4wöchigen Präinfektionsphase, d.h. nach Inokulation mit dem Endophyt und vor Inokulation mit dem Pathogen, wurde deutlich, dass sich *Phoma* sp. wahrscheinlich nicht als Endophyt für Eschensämlinge eignet, da bereits zu diesem Zeitpunkt 56% der Sämlinge Nekrosen, Blattwelke und -abwurf zeigten (Abb. 4.46 linkes Bild der rechten Bildgruppe). Ebenfalls die Inokulation mit *Epicoccum* sp. führte zu leichten Krankheitssymptomen bei 19% der Pflanzen (Abb. 4.46, Bilder Mitte). Einzig die Infektion mit *Phomopsis* sp. führte zu keiner sichtbar negativen Auswirkungen auf die Sämlingsentwicklung (Abb. 4.46, links). In Folge dessen wurden weitere Infektionsstudien nur mit dem Endophyten 9938 durchgeführt. Einige der in Babygläsern kultivierten Eschen wurden zuerst mit dem Endophyten *Phomopsis* sp. (9938) infiziert. Nach 4wöchiger Kultivierung wurde ein Teil dieser präinfizierten Sämlinge mit dem Isolat C 403, sowie noch unbehandelte Sämlinge mit C 403 allein infiziert (Kap. 3.15.5) und nach 6 Wochen bonitiert (Kap. 3.17). Die unbehandelten Kontrollen (Tab. 4.15) wiesen weder Chlorosen noch Nekrosen auf und zeigten eine unter Laborbedingungen normale Entwicklung von Laubblättern und verzweigten Wurzeln. Mit 9938 infizierte Pflanzen hatten wenige Anzeichen von Chlorosen, die vereinzelt trockenen Blattränder wurden bereits vor der Infektion beobachtet, weshalb dies nicht auf den Einfluss des Pilzes zurückzuführen ist. In Bezug auf den übrigen Zustand der Pflanzen wiesen sie normal entwickelte Laubblätter auf, zeigten aber verkürzte und dickere Wurzeln.

Tabelle 4.15: Infektion axenischer Eschensämlinge mit Inokulum des Endophyten 9938, des *H. p.*-Stammes C 403 und der Kombination 9938 und C 403. Fotos M. Messal

Pilz	Pflanzen vor der Infektion	Pflanzen 6 Wo nach der Infektion	Pflanzen nach der Infektion
Kontrolle			
9938			
C 403			
9938+C 403			

Bei der Infektion mit C 403 wurde bei 50% der Pflanzen die Entstehung von Blattnekrosen beobachtet. Zudem fielen sie bereits vor der Auswertung ab oder entwickelten sich wesentlich weniger ausgeprägt im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die Doppelinfektion, zunächst mit 9938 und nach 4 Wochen mit C 403 zeigte, dass die Sämlinge sich deutlich schlechter entwickelten, als die nur mit 9938 infizierten Pflanzen. Alle Blätter hatten Nekrosen und stagnierten in ihrer Entwicklung. Die Wurzeln entwickelten sich, wie auch bei der Infektion mit C 403 nur wenig.

Die Kontrollpflanzen als auch die nur mit dem Endophyten 9938 infizierten Sämlinge hatten durchschnittlich 6 Laubblätter. Die Sämlinge, welche mit dem Pathogen allein infiziert waren, hatten im Vergleich zur Doppelinfektion im Schnitt die gleiche Anzahl Laubblätter. Die Unterschiede bei der Anzahl der Blätter waren in keinem der Fälle signifikant.

Während die Wurzellänge bei den Kontrollen im Durchschnitt bei einem Wert von ca. 5 cm lag, hatten die Pflanzen infiziert mit 9938 ein um ca. 11% längeres Wurzelwachstum und bei der Doppelinfektion wurden die Wurzeln sogar um 34% länger im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die Unterschiede in der Sprosslänge waren optisch minimal und sind wie auch die Werte der Wurzellänge nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen. Allerdings wiesen die Sämlinge der Kontrollen mit ca. 1,5 cm den kürzesten Spross auf und die Pflanzen, infiziert mit 9938+C 403, mit 2,1 cm einen um knapp 30% längeren Spross.

Bei der Trockengewichtsbestimmung der Blätter wiesen die mit dem Endophyten 9938 infizierten Pflanzen den größten Wert mit knapp 41 g auf. Damit haben sie 27% mehr Blattmasse gebildet, als die Kontrollen und beim Trockengewicht der Wurzeln war es sogar dreimal so viel Gewicht. Zudem ist der Wert des Wurzeltrockengewichts bei den mit 9938 inokulierten Pflanzen signifikant unterschiedlich zur Kontrolle und zu den anderen beiden Infektionen, was auf die erhöhte Myzelmasse in den Wurzeln zurückzuführen sein könnte. Die mit dem Stamm C 403 beimpften Pflanzen haben im Vergleich zur Kontrolle bei allen Pflanzenabschnitten höhere Trockengewichtswerte, sie liegen aber unter den Werten der mit 9938 infizierten Sämlinge. Sämlinge, die mit beiden Pilzen, 9938 und C 403, beimpft wurden, hatten insgesamt 90% des Gesamttrockengewichts der

Kontrollen. Im Einzelnen zeigen sie aber die geringste Trockenmasse bei Wurzeln und Blättern. Betrachtet man das Trockengewicht der gesamten Pflanze, so liegt dies bei den Kontrollen bei durchschnittlich 46,6 g, bei 9938 infizierten Pflanzen bei 83,9 g, bei den C 403 beimpften Pflanzen bei 57,9 g und bei der Doppelinfektion bei 42 g. Damit haben die in Anwesenheit von 9938 gewachsenen Pflanzen ein um 55% höheres Trockengewicht, als die Kontrollen. Zudem haben die mit C 403 inokulierten Sämlinge 30% weniger Biomasse produziert als die Pflanzen mit 9938, aber 27% mehr als die Pflanzen, welche sowohl mit 9938 als auch mit C 403 beimpft wurden.

4.12 Hemmung der Fruchtkörperentwicklung von *H. pseudoalbidus*

Die in den Fruchtkörper von *H. pseudoalbidus* enthaltenen Ascosporen sind die treibende Kraft für die Verbreitung der Erkrankung. Darum ging es in diesem Ansatz vor allem darum, einen potenziellen Wirkstoff zu finden, der sowohl die Ausbreitung der Sporen durch bereits gebildete Fruchtkörper verhindert, als auch die Fruktifikation neuer hemmt. Es wurden zwei bereits zugelassene und für Ascomyceten geeignete Fungizide, der zur Verrottung und Düngung eingesetzte Kalkstickstoff und drei Pilzkulturextrakte von bereits in Dualkultur gegen Isolate von *H. p.* getesteten Endophyten auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.

Die Fungizide wurden wie in Kap. 3.20 beschrieben verdünnt und auf Blattspindeln aufgetragen, auf denen sich schon Fruchtkörper ausgebildet hatten. Nach siebentägiger Einwirkzeit unter konstanten Bedingungen (Kap. 3.20) wurden die Asci makroskopisch ausgewertet. Wie erwartet (Tab. 4.16), wirkte sich die jeweilig höchste Konzentration der Fungizide am negativsten auf die Fruchtkörper aus. Es wurden in allen Konzentrationen über 80% der Asci geschädigt. Es entstanden starke Verbräunung des gesamten Ascus (Abb. 4.47), zudem waren einige bereits vom Blattstiel abgefallen. Beim Vergleich der Fungizide verursachte die Behandlung mit Prosper 1:10 (Abb. 4.47) die größte nekrotisierende Wirkung, sodass fast alle Fruchtkörper stark verbräunt waren. Hinzu kam, dass es nur bei der Behandlung mit Prosper zu keiner Neubildung von Fruchtkörpern auf den Blattstielen kam. Nur die Behandlung mit Kalkstickstoff erzielte eine ebenso deutliche Hemmwirkung und führte außerdem zu 100% zum Absterben bereits vorhandener Asci (Abb. 4.48). Hinzu kam ein Verlust der Gestalt der Fruchtkörper, welche bereits nach einem Tag an Form und Stabilität verloren.



Abbildungen 4.47: Fruchtkörper von *H. p.* auf Eschenblattstielen 7d nach der Behandlung mit Mirage 1:10, Prosper 1:10 und die unbehandelte Kontrolle. Fotos C. Eickhorst

Tabelle 4.16: Fruchtkörper von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* behandelt mit drei verschiedenen Substanzen, z.T. in verdünnter Darreichung. Angegeben sind die Anzahl der getesteten Fruchtkörper als absolute Zahl am Tag Null vor der Behandlung, sowie prozentual (bezogen auf die Ausgangsgesamtzahl) die Auswirkung der Behandlung auf die Fruchtkörper, ausgewertet am Tag 7 nach der Behandlung. rot unterlegt besonders gute Wirksamkeit

	Tag 0	Tag 7			
Mittel (Verdünnung)	Anzahl Ascocarpe	nekrotisierte Ascocarpe [%]	abgefallene Ascocarpe [%]	gesunde Ascocarpe [%]	neu fruktifizierte Ascocarpe [%]
Mirage 1:10	413	91,6	2,9	5,5	6,1
Mirage 1:100	432	80,0	1,0	19,0	14,4
Mirage 1:1000	395	91,0	0,1	8,9	129,4
Prosper 1:10	450	99,6	0,4	0	0
Prosper 1:100	299	96,2	2,0	1,8	0
Prosper 1:1000	217	80,7	1,4	17,9	0
Kalkstickstoff	944	100,0	0,0	0,0	0
Kontrolle	1149	0,0	0,0	100,0	148,5



Abbildung 4.48: Fruchtkörper von *H. p.* auf Eschenblattstielen 7d nach der Behandlung mit Kalkstickstoff. Foto C. Junker

Die unterschiedlich hohe Zahl der getesteten Fruchtkörper ergab sich daher, dass auf den Blattstielen die Anzahl der Fruchtkörper so divers war, dass sie sich kaum gleichmäßig aufteilen ließen. So konnten sich auf einem einzigen Blattstiel über 300 Fruchtkörper befinden. Die hohe Anzahl bei der Kontrolle, im Vergleich zu den getesteten liegt darin begründet, dass jeder Ansatz eine eigene Kontrolle hatte und diese dann zusammengefasst wurden. Die Behandlung mit den Pilzkulturextrakten erwies sich ebenfalls als sehr vielversprechend. Alle drei Extrakte wirkten stark nekrotisierend auf die Fruchtkörper (Abb. 4.49) und erwiesen sich zudem im Fall von Extrakt 9939 und 9942 als inhibierend auf die Entstehung neuer Asci, was wiederum die Entstehung neuer Sporenbildner verhindert (Tab. 4.17).

Tabelle 4.17: Fruchtkörper von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* behandelt mit den Pilzkulturextrakten 9938, 9939 und 9942. Angegeben sind die Anzahl der getesteten Fruchtkörper als absolute Zahl am Tag Null vor der Behandlung, sowie prozentual (bezogen auf die Ausgangsgesamtzahl) die Auswirkung der Behandlung auf die Fruchtkörper, ausgewertet am Tag 7 nach der Behandlung. rot unterlegt besonders gute Wirksamkeit

Kulturextrakt	Tag 0	Tag 7			
	Anzahl Ascocarpe	nekrotisierte Ascocarpe [%]	abgefallene Ascocarpe [%]	gesunde Ascocarpe [%]	neu fruktifizierte Ascocarpe [%]
Stamm 9938	175	96,0	0,5	3,5	17,7
Stamm 9939	185	95,0	3,3	1,7	0
Stamm 9942	277	98,7	1,3	0,0	0
Kontrolle MeOH/Ac	247	0,0	0,0	100,0	170,5



Abbildung 4.49: Fruchtkörper von *H. p.* auf Eschenblattstielen 7d nach der Behandlung mit den Extrakten 9938, 9939, 9942 und dem Lösungsmittel MeOH/Ac. Fotos C. Junker

Die Grafik (Abb. 4.50) stellt nochmal alle Ergebnisse der Fruchtkörperbehandlung gegenüber. Hier wird nochmal besonders deutlich, dass bei den Fungiziden die Behandlung mit Prosper, selbst in einer Konzentration von 1:1000 noch immer so effektiv ist, dass sich keine neuen Asci auf den Blattstielen entwickeln konnten (beige Balken, $p < 0.001$). Der Grad der Nekrotisierung ist bei allen Mitteln sehr hoch und liegt immer über 80%. Einzig die Behandlung mit Kalkstickstoff wirkt sich stark schädigend auf die Vitalität aller Asci aus, aber auch der Pilzkulturextrakt von 9942 zeigt eine extrem hohe Mortalität der Fruchtkörper infolge der Behandlung. Darüber hinaus gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Effizienz der Kulturextrakte. Insgesamt zeigen alle applizierten Mitteln im Vergleich zu den Kontrollen hohe signifikante Unterschiede.

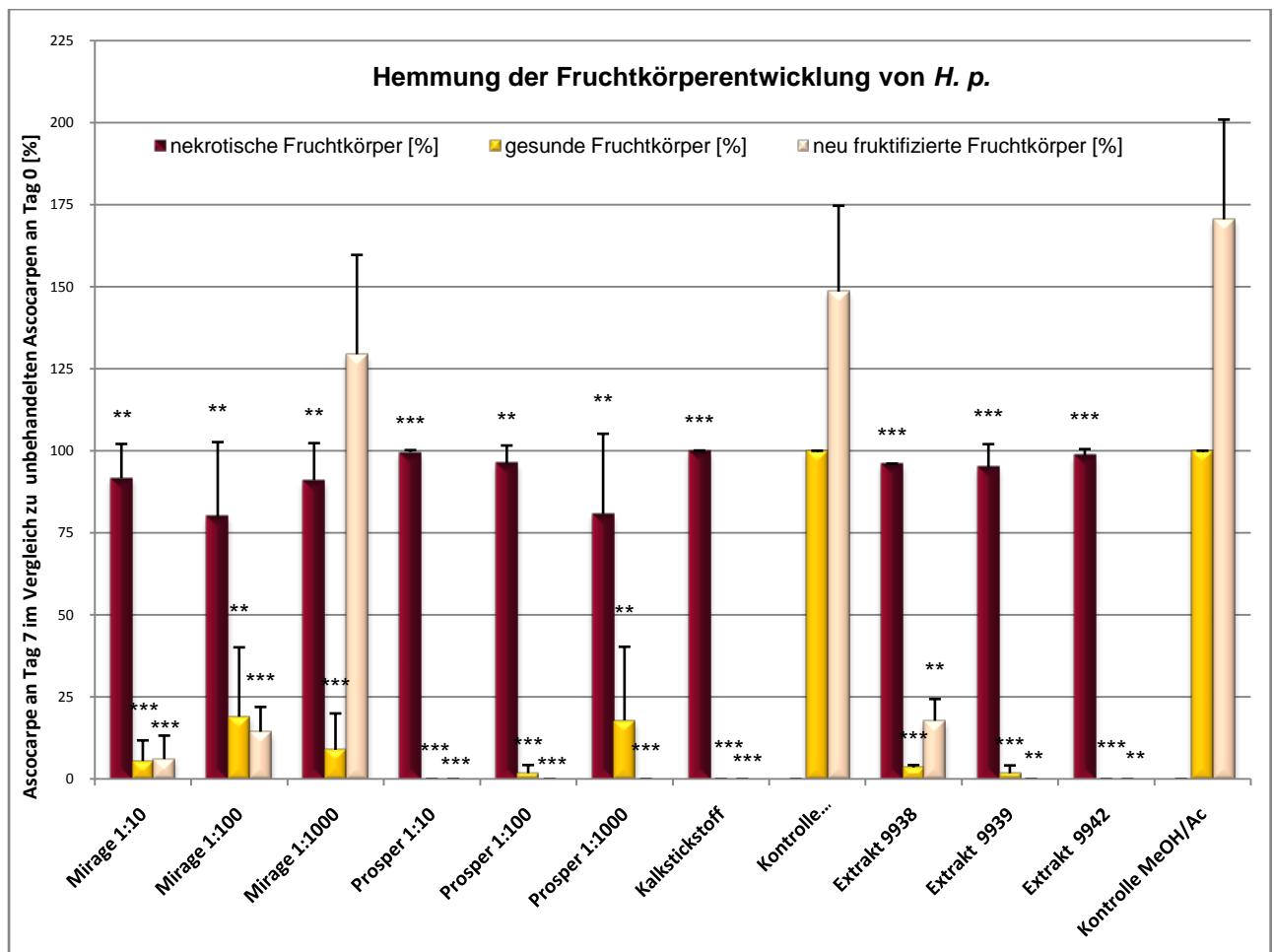


Abbildung 4.50: Unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener auf Fruchtkörper von *H. pseudoalbidus* applizierter Mittel. Inkubation für 7 d auf feuchtem Untergrund bei 20 °C und 8 h Licht (800 x 10 Lux). Untersucht wurde der prozentuale Anteil nekrotischer (rote Balken), gesunder (gelbe Balken) und neu entstandener (beige Balken) Fruchtkörper, 7 d nach der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

5. Diskussion

Ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende Charakterisierung des Phytopathogens *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, dem Erreger des Triebsterbens an der Gemeinen Esche (*Fraxinus excelsior*) in Europa. Ein weiterer Schwerpunkt lag in der Untersuchung der Virulenzfaktoren des Pilzes, die für die Pathogenität des Pilzes verantwortlich sind. Grundlage für die Untersuchungen waren 175 Isolate des anamorphen Stadiums von *H. p.*, die allesamt aus nekrotischen Gewebe erkrankter Eschen stammen. Im Fokus der Untersuchungen standen dabei die Morphologie der Isolate in Bezug auf makroskopische und mikroskopische Merkmale, Screenings und Analysen der Exoenzyme und Sekundärmetabolite sowie die genetisch eindeutige Zuordnung der Stämme zu *H. p.*, da dies bis dato noch nicht erfolgte. Von besonderem Interesse waren die Studien zur Virulenz und damit verbunden die Differenziertheit unter den Isolaten. Methodisch kamen dabei, neben der Isolation und Identifikation etwaiger Virulenzfaktoren (Exoenzyme, Sekundärmetabolite) auch die Überprüfung auf wachstumshemmende und nekrotisierende Eigenschaften der Pilzkulturextrakte gegen die Testorganismen *Chlorella fusca* und *Agrostis stolonifera*, sowie Blättern und Sämlingen von *Fraxinus excelsior* zum Einsatz. Im Weiteren sollten Inokulationsversuche an axenischen Sämlingen von *F. excelsior* und *Ocimum basilicum* Beweise für die Annahme erbringen, dass die verschiedenen Isolate in ihrer Virulenz variieren. Zudem galt es Ansätze und Möglichkeiten zu eruieren, die die weitere Ausbreitung des Pathogens verhindern könnten. Optionen hierfür boten sich durch die Suche nach antagonistisch agierenden endophytischen Pilzen, aber auch nach bereits bekannten antifungischen Wirkstoffen. Eine Quelle für antagonistische Endophyten waren die Eschen selbst. Hieraus isolierte Pilze wurden in Dualkulturen mit dem Pathogen auf ihre Potential untersucht, das Wachstum von *H. p.* zu hemmen. Ein weiterer Ansatz waren Untersuchungen an den Fruchtkörper von *H. p.*, deren Ascosporen die Eschenbäume infizieren und zur Entstehung von Blattwelke, Nekrosen und Triebsterben führen. Ihre Fruktifikation auf Eschenblattspindeln sollte mit diversen bereits erhältlichen Fungiziden, aber auch mit Hilfe eines Verrottungsbeschleunigers und Kulturextrakten der Pilzendophyten unterdrückt werden. Nicht zuletzt wurde überprüft, inwieweit eine Kausalität

zwischen den Parametern Herkunft, Morphologie, Exoenzyme, Sekundärmetabolite und Virulenz besteht. Daraus resultierende Zusammenhänge sollen die Suche nach der Ursache der Pathogenität unterstützen.

5.1 Morphologische Charakteristika

H. pseudoalbidus gilt mittlerweile unter vielen Autoren als primärer Verursacher des Eschentriebsterbens (Chandelier et al., 2010; Engesser et al., 2009; Kirisits & Cech, 2009; Kowalski und Holdenrieder, 2009a, b; Schumacher et al., 2009; diverse Waldschutz-Informationsberichte der verschiedenen Bundesländer). Dies wird vor allem dann deutlich, wenn es darum geht, den Pilz in erkrankten Geweben seines Wirtes nachzuweisen. Die dominierende Spezies war hierbei immer die Anamorphe Form, vormals als *Chalara fraxinea* bezeichnet. (Kowalski, 2006; Schumacher et al. 2007; Kirisits, 2008; Bakys et al., 2009). Mit einer Nachweisquote von über 50% aller aus erkrankten Geweben isolierten Pilze konnte der Pathogen auch in unserem Labor isoliert werden. Zudem wurden Pilze anderer Gattungen isoliert und bestimmt, welche aber nicht in Verbindung mit den verursachten Nekrosen stehen (Schumacher et al., 2007; Bakys et al., 2009a, b) (Kap. 4.1).

5.1.1 Teleomorph

Der Teleomorph, die Hauptfruchtform von *H. pseudoalbidus* bildet ca. 2 mm kleine cremefarbene Fruchtkörper, die in Form von Apothezien auf abgefallenen Blattstielen der Esche im darauf folgenden Jahr zwischen Mai und Oktober fruktifizieren. Die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (Kap. 4.2) sind bis dato einmalig und zeigen die charakteristische Schicht des Pseudosklerotiums im Holz der Eschenspindel (Kirisits und Cech, 2009; Kowalski und Holdenrieder, 2009a). Es besteht aus einem Netz zahlreicher Hyphen und durchzieht die oberen Zellschichten im Holz. Hieraus entwickelte sich der Fruchtkörper, welcher sich, wie die Aufnahme 4.3 gut zeigt, in Stiel, Apothezium und Hymenium gliedert. Zum ersten Mal können in histologische Längs- und Querschnitte von den Fruchtkörpern von *H. p.* die lokalisierte Ausbreitung des Myzels in der Blattspindel gezeigt werden (Abb. 4.10 bis 4.13). Das Pseudosklerotium war beinahe ausschließlich in den äußeren Zellschichten, in der Nähe des Fruchtkörpers zu finden und nur vereinzelt auch im Mark. Die Bildung des Pseudosklerotiums ist eine Vorstufe der späteren

Apotheziumentstehung. Sie ist charakteristisch für viele pathogene Ascomyceten, z. B. *Monilinia* (Honig, 1928). Es ist auffällig, dass die Entwicklung der Hyphen in der pseudosklerotischen Schicht zu erheblichen Schäden in den äußeren Schichten des Blattstielgewebes (Abb. 4.10 bis 4.12) führt, zudem bilden die Hyphen ein dichtes Netz unter dem Apothezium in der Nähe der Epidermis des Blattstiels (Abb. 4.11 und 4.12). Die Verdauung des Blattstielgewebes dient der Ernährung und ist wichtig für die spätere Entwicklung des Apotheziums. In Anbetracht der späteren Entwicklung des Blattstielgewebes, könnte man postulieren, dass es sich um eine hemibiotrophe Strategie seitens des Pathogens handelt, welche die Entwicklung des Apotheziums von *H. pseudoalbidus* antreibt.

Zudem ließen die Aufnahmen erkennen, dass die Hyphen des Plektenchyms (innere Schicht) länglich, hingegen die des Excipulums (äußere Schicht) kleinzellig sind. Noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte eine helle, kugelförmige Struktur an der Basis des Apotheziums (Abb. 4.10 bis 4.12). Ob es sich dabei um ein spätes Stadium des Primordiums (Kimbrough, 1981) handelt oder eine bis dato nicht definierte Anordnung spezifischer Zellen, konnte anhand der Literatur und in Austausch mit anderen Wissenschaftlern nicht abschließend geklärt werden.

Ebenfalls neu waren Nahaufnahmen der Asci, die zusammen mit dem Paraphysen das Hymenium bilden. Die dreidimensionale Ansicht im REM (Abb. 4.8) macht ihre zylindrisch-keulenförmige Gestalt mit den darin, durch Hervorwölbungen an der Ascuswand sichtbar, enthaltenen Ascosporen deutlich. Besonders die Detailansicht der Ascusspitze (Abb. 4.9) zeigt, dass diese eine aufgeraute Oberfläche besitzt und dass apikal eine Öffnung zum Sporenaustritt vorhanden ist. Zusammen mit den lichtmikroskopischen Ansichten (Abb. 4.4 bis 4.7), vor allem der elliptischen Sporen und der inoperculaten langgestreckten Asci (Abb. 4.7 und 4.9), wird die Zuordnung von *H. p.* zur Ordnung der Helotiales untermauert (Esser, 2000; Kowalski, 2006; Timmermann, 2011).

Erste Beschreibungen des Ascocarps fanden anhand der avirulenten Schwesterart *Hymenoscyphus albidus* (Roberge) Phill. statt. Der Ascocarp von *H. albidus* wurde ursprünglich als *Peziza albida* durch Desmazières (1851) beschrieben und später als *Hymenoscypha albida* von Phillips (1893), gefolgt von Rehm (1896) als *H. albidum*. Die Einordnung der Art in die Gattung *Helotium* erfolgte durch Dennis (1956), der den Pilz in *H. robergei* umbenannte. In einer anschließenden Neubewertung der

Taxonomie der verschiedenen Gattungen der Helotiales ordnete Dennis (1964) die Mehrheit der Spezies, zuvor *Helotium*, in die Gattung *Hymenoscyphus*, einschließlich *H. robergei*, ein. Die Beschreibungen von *H. albidus* von Ellis und Ellis (1985) und Breitenbach und Kränzlin (1981) unterscheiden sich nur geringfügig von denen von Rehm (1896) und Phillips (1893). Molekulare Untersuchungen der Gattung auf Basis von Sequenzanalysen der rDNA ITS1-5.8S-ITS2 Region von Zhang und Zhuang (2004) und Zhuang und Liu (2007) bestätigten die monophyletische Beziehung der meisten Mitglieder der Gattung, welche ursprünglich auf der Basis der morphologischen Eigenschaften, z. B. Dennis (1956) durchgeführt worden war. Die meisten der Discomyceten sowohl inoperculate als auch operculate, entwickeln ein Kleistothezium (Kimbrough, 1981).

Wie in den SEM-Aufnahmen gezeigt (Abb. 4.3), besteht das äußere Excipulum von *H. pseudoalbidus* aus einem komplexen Gewebe, *textura intricata*, das medulläre Excipulum im Stiel ist auch komplex, enthält aber auch kugelförmigen Elemente (*textura globulosa*), das medulläre Excipulum im Rezeptakulum scheint aus einer *textura porrecta* oder *textura oblita* zu bestehen (Alexopolus et. al., 1996). Diese Beschreibung der Anatomie gab für diese Gattung noch nicht, obgleich lichtmikroskopische Untersuchungen die erhebliche Variabilität in der Anatomie des Excipulums der Helotiales und auch innerhalb der Gattung *Hymenoscyphus* (Dumont, 1981; Lizon, 1992) deutlich machten. Es gibt offensichtlich auch Unterschiede in der Anatomie der verschiedenen Isolate der gleichen Spezies, beispielsweise unterscheidet sich die des Excipulums manchmal bei kleineren und größeren Fruchtkörpern (Verkley, persönliche Mitteilung). Dennis (1956) und Kimbrough und Atkinson (1972) wiesen darauf hin, dass die Zellen der äußeren Schichten des Excipulum kurze, schlanke, stumpfe Haare produzieren. Diese könnten verantwortlich für die grobe oder fransige Oberfläche des Excipulums sein. Ebenso denkbar wäre, dass die zerfranse Erscheinung der äußeren Schicht auf Reste des bedeckenden Gewebes zurückzuführen sind, welches infolge des heran reifenden Apotheziums aufreißt, um das Hymenium frei zu geben (Pfister, 1993).

Die Ascusspitze von *H. pseudoalbidus* (Abb. 4.7 und 4.9) ist abgerundet, wird aber danach zusehends breiter. Diese Morphologie wurde in ähnlicher Weise für den Art *H. caudatus*, aber auch für *H. salicellus* und *H. fructigenus* beschrieben (Verkley, 1993), obwohl das Ascusende von *H. pseudoalbidus* etwas spitzer zu sein scheint.

In der Art und Weise, wie der apikale Apparat mit seiner apikalen Verdickung (Abb. 4.7) lichtmikroskopisch erscheint, hat er viel Ähnlichkeit mit dem von *H. caudatus* (Verkley, 1993) und *H. laetus* (Baral, 1987). Weder der Ring noch der zentrale Zylinder des intakten Ascus konnten im Lichtmikroskop deutlich dargestellt werden.

Das Material, ausgestoßen aus dem aufgeplatzten Ascus, ist gut in Abb. 4.9 sichtbar. Während einige Autoren dies als "Pfropfen" oder "Porenpfropfen" bezeichnen, behauptet Verkley (1993), dass diese Nomenklatur ungenau ist. Mit ihm übereinstimmend, deutet es darauf hin, dass der zentrale Zylinder aus dem Ring als eine Einheit während des Aufplatzens getrennt wird. In keinem unserer Präparate konnten wir deutlich den Ring erkennen, den Verkley (1993) als rechtwinklig umgestülpt auf der Spitzen des aufgeplatzten Ascus beschreibt. Unsere Annahmen gehen dahin, dass es sich bei dem amorphen Material um Reste der apikalen Verdickung, des zentralen Zylinders, des umgestülpten Rings und Epiplasma handelt.

5.1.2 Anamorph

Die Sammlung von 175 Isolaten des anamorphen Stadiums von *H. p.* stammte aus den verschiedensten, überwiegend deutschen Regionen und ermöglichte es, einen umfangreichen Vergleich zwischen den Isolaten anzustellen. Neben dem äußerlichen Erscheinungsbild (Farbgebung und Beschaffenheit des Luftmyzels), wurden die anamorphen Isolate auch mit einem Licht- und Rasterelektronenmikroskop untersucht und nicht zuletzt ihre Wachstumsgeschwindigkeit auf künstlichen Nährmedien dokumentiert. Die Tabelle 9.1 im Anhang fasst die enorme Vielseitigkeit zusammen, welche die Stämme beim Wachsen in Kultur zeigten. Dabei glich kein Stamm dem anderen. Trotzdem wurden alle Isolate anhand mikroskopisch sichtbarer Eigenschaften eindeutig dem anamorphen Stadium zugeordnet. Zu den mikroskopisch-morphologischen Charakteristika gehören ein subhyalines bis intensiv pigmentiertes Myzel mit Phialophoren, Phialiden und Konidien (Schumacher et al., 2007). Die vegetativen Hyphen stellten sich meist farblos bis schwach braun dar und hatten einen Durchmesser von 1 - 2,5 µm (Kowalski, 2006, Schumacher et al., 2007), je nach Alter des Myzels. Die Phialophoren, welche meist in reduzierter Form, den Phialiden vorlagen, waren keulenförmig und zweigten sich seitlich von den vegetativen Hyphen ab. Der Anamorph von *H. p.* unterscheidet sich zu anderen

Chalara-Arten durch sehr kleine, kurze zylindrische Konidien, die in Ketten oder in schleimigen Tröpfchen abgegeben werden. Sie sind zudem einzellig, glattwandig mit runden oder abgestumpften Enden und hyalin bis subhyalin mit ein oder zwei Öltröpfchen (Kowalski, 2006, Schumacher et al., 2007). Es ist die einzige Art von *Chalara*, die Konidien mit einem Länge/Breite Verhältnis von 1.4:1 oder weniger bildet (Kowalski, 2006). Die Phialophoren sind zwei- bis dreimal kürzer als die anderer Arten der Gattung und die Phialiden sind meist subzylindrisch und pigmentiert (McKenzie et al., 2002, Schumacher et al., 2007).

Makroskopisch ließen sich die Isolate nur grob nach ähnlicher Färbung des Luftmyzels einteilen, obgleich sie nicht unbedingt aus dergleichen Region stammten. Aufgrund dessen gibt es keine Korrelation zwischen Herkunft und makroskopischen Eigenschaften ($P = 0,55$). Ein derartiger Vergleich von verschiedenen Isolaten war in keiner Literatur zu finden. Allerdings wurden Parallelen bei der Beschreibung der Pilzkulturen gefunden. So stimmt es überein, dass zu Beginn der Kultivierung sich zunächst weißes Myzel um das Impfstück ausbildet, welches mit zunehmendem Alter die Farbe verändert. Die beschriebene Pigmentierung weist ein ähnliches Farbspektrum von Braun- und Grauschattierungen im Vergleich zu den Beschreibungen anderer Isolate in der Literatur auf (Kowalski, 2006, Kowalski und Bartnik, 2010). Die makroskopisch vielgestaltigen Stämme zeigten allerdings im mikroskopischen Vergleich kaum Unterschiede. Wie auch von Kowalski (2006) und Schumacher et al. (2007) beschrieben, weisen alle die gleichen Strukturen der Hyphen, Phialiden und Konidien auf, was natürlich dafür spricht, dass es sich um Isolate derselben Art handelt, zu bestimmen anhand dieser Merkmale. Die äußerlichen Divergenzen sind demnach auf den Genotyp zurückzuführen, welcher für den Phänotyp maßgebend ist. Das wiederum spricht für eine hohe genetische Diversität unter den Isolaten, obwohl die Sequenzierung der DNA von 27 Isolaten die Zugehörigkeit zu *H. pseudoalbidus*, die anhand der Morphologie des Anamorphs vorgenommen wurde, bestätigten.

5.2 Kultivierung

Die optimale Wachstumstemperatur des Anamorphs liegt bei ca. 20 - 25 °C. Dies korreliert mit dem bisherigen Auftreten des Erregers, dessen Nachweis in Südostskandinavien, ganz Deutschland und allen angrenzenden Ländern gelang

(Kap. 2.1). Der Teleomorph von *H. p.* braucht vor allem ein feuchtes Milieu und mittlere Temperaturen sowie genügend Licht, um fruktifizieren zu können. Dies erklärt das Auftreten der Fruchtkörper auf den Blattspindeln in der wärmeren und lichtintensiveren Jahreszeit, zwischen den Monaten Mai und Oktober (Kirisits und Cech, 2009; Timmermann et al., 2011). Trotzdem wird es vermutlich nur eine Frage der Zeit sein, bis es Stämme geben wird, die eine höhere Toleranz gegenüber wärmeren Temperaturen haben und sich auch in Ländern nachweisen lassen, die bisher verschont geblieben sind. So hat der Pilz beispielsweise bereits den Sprung über die Alpen geschafft und ist im Jahr 2009 erstmals auch in Slowenien gefunden wurden (Engesser et al., 2009; Ogris et al., 2009). Für diese rasche Ausbreitung sprechen vor allem die extrem flugfähigen Sporen der Hauptfruchtform *H. pseudoalbidus* (Kirisits und Cech, 2009, Timmermann et al., 2011), was von vielen Wissenschaftlern als eine Erklärung für die zum Teil weit voneinander entfernten Fundorte erkrankter Eschenbäume ist (Engesser et al., 2009; Waldschutzinfo 4/2009). Dem entgegen steht, dass während der Kultivierung beobachtete, langsame Wachstum der anamorphen Isolate (Kowalski, 2006, Engesser et al., 2009). Diese Eigenart ist auch in der Natur, während der Besiedlung der Esche zu finden. Denn oftmals bleibt die Erkrankung, bis zur Entstehung erster Symptome, lange Zeit unentdeckt (Engesser et al., 2009). Dies trifft vor allem auf ältere Bäume zu, deren Immunabwehr besser etabliert ist, als bei Jungpflanzen (Berger et al., 2010).

5.3 Genetik

Genetisch konnten bisher 27 der 175 Isolate dem Teleomorph *Hymenoscyphus pseudoalbidus* zugeordnet werden. Dafür wurden die erhaltenen Sequenzen der Isolate mit bereits in der Datenbank von NCBI von Queloz et al. (2011) hinterlegten Sequenzen für *H. albidus* und *H. pseudoalbidus* verglichen. Dabei zeigte sich, dass in Abhängigkeit des zum Vergleich gewählten Isolates von Queloz et al., es nicht immer zu 100% Übereinstimmung kam. Diese Beobachtung machten neben Queloz et al. (2011) auch andere Wissenschaftler, mit der Erkenntnis, dass unter den verschiedenen Isolaten eine hohe genetische Diversität besteht (Bengtsson et al., 2012; Gross et al., 2012b; Rytkönen et al., 2011). Ergebnisse hierzu lieferten Untersuchungen der Loci für ITS (internal transcribed spacer), Calmodulin und des

Translations-Elongationsfaktor 1- α der rDNA Gene, aber auch ISSR-Fingerprinting (Queloz et al., 2011) sowie der Einsatz von Mikrosatelliten (Bengtsson et al., 2012, Gross et al., 2012a) und RAMS (Rytkönen et al., 2011). So konnte auch gezeigt werden, dass *H. p.* heterothallisch ist, gestützt durch die Präsenz von zwei verschiedenen Myzeltypen in den Apothezien. Dies ist wichtig für die sexuelle Rekombination, was in einer erhöhten Fitness des Pathogens resultiert und diesem zudem ermöglicht, Virulenz zu entwickeln (Bengtsson et al., 2012, Gross et al., 2012b). Ebenso Untersuchungen von Kowalski und Bartnik (2010), als auch die eigenen Ergebnisse, die eine starke Variabilität der Makromorphologie zeigten implizieren, dass *H. p.* einen heterothallischen Lebenszyklus hat, welcher die genetische Variation fördert (Hietala und Solheim, 2011). Die oben genannten Techniken ermöglichen es zudem zwischen den beiden, äußerlich nicht divergenten, Arten *H. a.* und *H. p.* zu unterscheiden.

Informationen und Sequenzdaten zu einigen der eigenen Isolate sind ebenfalls bei NCBI Blast unter den Nummern KC576528 bis KC576539 hinterlegt.

5.4 Vegetative Kompatibilität

Der Versuch, die Isolate in verschiedene vegetativ kompatible Gruppen einzuteilen, konnte nicht eindeutig ausgewertet werden. Selbst wenn in einigen wenigen Fällen ein Aufeinandertreffen der Hyphen zu beobachten war, so konnte bei genauerer Betrachtung im Mikroskop keine Anastomosenbildung festgestellt werden. Normalerweise sollten genetisch verschiedene Isolate Reaktionen in der Kontaktzone zeigen, kompatible Myzelien dagegen verschmelzen (Mounce, 1929; Caroll & Wicklow, 1992, Luschka, 1993). Verantwortlich für die nicht Auswertbarkeit könnte zum einen das Kulturmedium sein, auf dem einige Pilze schlecht oder gar nicht wuchsen. Andere hingegen schienen mit den Kulturbedingungen gut zurecht zu kommen und zeigten eine normale Entwicklung, zumindest bis kurz vor dem Aufeinandertreffen beider Myzelien. Zu diesem Zeitpunkt stagnierte das Wachstum. Hierfür gibt es sowohl in der Literatur als auch nach Rücksprache mit Herrn J. Schumacher bislang keine Erklärung. Möglich ist, dass die Stämme bisher unbekannte Stoffe ins Medium abgeben, die sie gegenseitig in ihrem Wachstum hemmen, nach dem Prinzip des Konkurrenzverhaltens. Ein bereits bekannter Stoff hingegen ist Viridin, welcher als Vorstufe einer anderen Substanz, Viridiol, aus

Kulturen des Anamorphs von *H. p.* isoliert werden konnte (Andersson et al., 2010). Im Gegensatz zu Viridiol, zeigte Viridin fungizide Aktivität gegen eine Vielzahl von Pilzen (Brian und McGowan, 1945) und wäre womöglich eine der Substanzen, die für die beobachteten Wachstumshemmungen verantwortlich ist. Die vc-Tests wären eine wichtige Ergänzung zu den Pathogenitätsuntersuchungen gewesen, um deren Aussagen zu korrigieren oder zu bestätigen, denn Isolate, die vegetativ kompatibel sind, sind sich genetisch ähnlicher als inkompatible und teilen somit meist auch Eigenschaften, wie Pathogenität (Niere et al., 2000). Bengtsson et al., (2012) gelang die Etablierung eines solchen Tests mit 41 Isolaten aus Dänemark, Schweden, Polen, der Tschechischen Republik und Deutschland. Die Auswertung erstreckte sich über zwei Jahre und ergab, dass es bei keinem der Isolate zu einer Barrierenbildung kam und sie sich nicht in den selbst-selbst-Interaktionen unterschieden. Diese Erkenntnis ist wichtig, denn so würde sich die Möglichkeit bieten, hypovirulente Stämme von *H. p.* einzusetzen, wie es bei der Bekämpfung des Kastanienkrebs in Europa bereits erfolgreich praktiziert wurde. Hypovirulente Stämme besitzen einen Virus mit doppelsträngiger RNA und haben die Eigenschaft, nur milde Krankheitssymptome auszulösen, mit denen die Pflanzenabwehr gut zurecht kommt. Voraussetzung zur Übertragung der Hypovirulenz über die Hyphen, ist die Fähigkeit der Stämme untereinander Anastomosen auszubilden, d. h. vegetativ kompatibel zu sein (Heiniger und Rigling, 1994, Robin und Heiniger, 2001). Deshalb ist es erforderlich, die Anzahl der vc-Gruppen zu ermitteln, um diese nachhaltige und biologische Bekämpfungsmethode erfolgreich einzusetzen. Daher wäre es für die Anwendung dieser Methode vom Vorteil, wenn wie vom Bengtsson et al. (2012) fest gestellt, es nur eine vc-Gruppe gäbe.

5.5 Virulenzfaktoren: Exoenzymaktivität und toxische Sekundärmetabolite

Zu den Virulenzfaktoren von Pilzen zählen vor allem Exoenzyme und Sekundärmetabolite. Exoenzyme ermöglichen nicht nur die Zerlegung der Substrate in Monomere für die Ernährung und Verdauung des Pilzes, sondern dienen auch als Virulenzfaktoren bei der Infektion und Besiedlung des Wirtes. Sie ermöglichen es dem Pathogen, die natürlichen Barrieren der pflanzlichen Abwehr zu überwinden, indem sie die Zellwände penetrieren, welche unter anderem aus Cellulosen, Pektinen, Hemicellulosen und Lignin bestehen. In der Folge kommt es zum

Aufquellen und Tod des Wirtsgewebes, wodurch sie die Zellen passieren können. Eine bedeutende Rolle in diesem Prozess spielen Enzyme wie Cellulasen, β -Glucosidasen, Laccasen, Peroxidasen, Polyphenoloxidasen und Lipasen (Griffin, 1994; Agrios, 1997). Ebenso können die Sekundärmetabolite der pathogenen Pilze Wirtsgewebe abtöten, oder aber Krankheiten auslösen indem sie u.a. als Phytohormone, Signalsubstanzen oder als Siderophore fungieren (u.a. Demain & Fang, 2000). Die Sekundärmetabolite eines Organismus können auch Verwandtschaften erkennbar machen (Frisvad et al., 1998).

Durch Kultivierung aller Isolate auf Spezialnährmedien, konnte die Ernährungsweise der Pilze veranschaulicht werden. Beim Auswerten der Enzymassays wurde deutlich, dass jedes Isolat ein eigenes Exoenzymprofil hat, was so individuell zu sein scheint, wie der morphologische Phänotyp. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Voraussetzungen unter Laborbedingungen, die Exoenzymproduktion zu induzieren, nicht die gleichen sind, wie in ihrem natürlichen Habitat, der Esche. Folglich ist es möglich, dass Enzyme nicht nachweisbar waren, was aber nicht ausschließt, dass das Isolat nicht dazu fähig wäre, diese zu sezernieren. Im Umkehrschluss bedeutet es, dass allein der Nachweis der Fähigkeit ein bestimmtes Enzym zu produzieren, noch keine Aussage darüber zulässt, ob dies auch im Wirt geschieht (Pointing et al., 2005). Die Übersicht in Abbildung 4.23 (Kap. 4.4) fasst gut die Häufigkeiten zusammen, mit der ein bestimmtes Exoenzym produziert wurde und stellt somit eine Wahrscheinlichkeit für jedes Enzym dar, mit der es womöglich am Infektionsprozess beteiligt ist, vorausgesetzt die Enzyme werden auch *in planta* sekretiert. Dabei ist vor allem der enzymatische Abbau der in der Wirtspflanze vorhandenen Kohlenhydrate und Fette wichtig (Zellner, 1910), da sich der Pilz davon ernährt. Die Häufigkeit mit der das Enzym Amylase (Abbau von Stärke zu Glucose) gebildet wurde, lag allerdings nur bei 40%. Ein anderes Enzym hingegen, die Lipase (Fettabbau), wurde wie beschrieben (Kap. 4.4) von 95% aller Isolate sezerniert. Dies lässt die Vermutung über eine hohe Bedeutung dieses Enzyms für den Pilz zu. Zumal von Schumacher et al. (2009) in histologischen Analysen gezeigt werden konnte, dass es u.a. in den Holzstrahlen (Parenchym ist reich an Fetten und Stärke) von erkrankten Bäumen eine großen Hyphendichte gibt. Im Weiteren zeigen diese Aufnahmen, mit welcher Intensität sich der Pilz im Inneren des Baumes ausbreitet. So wurde deutlich, dass sich die Hyphen vor allem in axialen und paratrachealen

Strahlengewebe befinden. Durch primäre Besiedlung der inneren Bereiche des Holzes, rufen sie Verbräunungen entlang der Markröhre hervor. Dies ermöglicht ihnen ein Fortkommen in axialer und anschließend in radialer Richtung über die Holzstrahlen (Schumacher, 2011). Ligninabbau ist dabei für einen Holzbesiedler eine essentielle Fähigkeit. Für die Mineralisierung jener extrem abbauresistenter Substanz (Pointing et al., 2005), stehen den Pilzen eine Reihe verschiedener Enzyme zur Verfügung (Kap. 3.8.3 - 3.8.5). Die Untersuchungen zeigten, dass dabei besonders zwei dieser Enzyme, Tyrosinase und Laccase, produziert werden (Kap. 4.4). Während die Fähigkeit Cellulose abzubauen unter Pilzen weit verbreitet ist, (auch bei 87% aller *H. p.* - Isolate), stellt der Abbau von Lignin eine Herausforderung dar (Matsubara & Iwasaki, 1972). Mit einem hohen Potential, Holz im lebenden Wirt abzubauen, ist *H. p.* damit als ein aggressiver Pilzpathogen des Baums anzusehen. Gleichzeitig zeigen die Studien zur Exoenzymaktivität die Diversität unter den Isolaten, was ihre Anpassungsfähigkeit an die Umweltgegebenheiten zum Ausdruck bringt.

Die Untersuchungen zu Sekundärmetaboliten waren ebenfalls von gesteigertem Interesse, da sie als potentielle Virulenzfaktoren viel über die Pathogenität des Erregers aussagen können. Sekundärmetabolite können toxisch für Wirtspflanzen sein (Wheeler, 1981) und haben die unterschiedlichsten zellulären Ziele, wie Änderung der Genexpression, Minimierung der Zellmembranintegrität oder Inhibition der Enzymaktivität der Pflanze. Gleichwohl haben diese niedermolekularen Substanzen eine wichtige Funktion im Infektionsprozess und sind oft verantwortlich für die Symptome, die durch die Krankheit ausgelöst werden (Möbius & Hertweck, 2009).

Zur Gewinnung der Sekundärmetaboliten wurden von Pilzkulturen Extrakte hergestellt (Kap. 3.10), die ein Gemisch verschiedenster Substanzen beinhaltet. Dieses Gemisch wurde auf unterschiedliche Weise untersucht, um einerseits die enthaltenen Metaboliten zu erkennen und andererseits, um die Aktivität der Kulturextrakte in Biotests festzustellen. Hierzu wurden frische Eschenblätter mit den Extrakten inkubiert und auf mögliche Schäden durch die darin enthaltenen Metabolite untersucht. Als weiteres wurde die Auskeimfähigkeit von Samen von zwei verschiedenen Pflanzenarten, der Esche und dem nahe verwandten Basilikum, untersucht. Diese Studien wurden zudem zuvor mit Samen von *Agrostis stolonifera*

und mit der Alge *Chlorella fusca* durchgeführt. Letztere Ergebnisse sind aber aufgrund der entfernten Verwandtschaft zur Esche nur eingeschränkt auf diese zu übertragen. Zur Gegenüberstellung und Korrelationsprüfung wurden diese Resultate nochmal in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 5.1). Blau schattiert zeigt, inwiefern die Resultate des Blattsegmenttests mit denen des Auskeimtest der Eschensamen wechselwirken. Bei etwa der Hälfte der untersuchten Kulturextrakte gibt es sehr gute Parallelen zwischen den beiden Tests.

Tabelle 5.1: Übersicht aller Pathogenitätstests mit Pilzkulturextrakten verschiedener Stämme von *H. pseudoalbidus* (*H. p.*), blau = Parallelen der Ergebnisse zwischen Blattsegmenttest und Samenauskeimtest von *F. excelsior*, rote Umrandung = gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Biotests von *C. fusca*, *A. stolonifera* und Samenauskeimtest von *O. basilicum* mit den Tests von Blättern und Samen von *F. excelsior*, BM = Biomalzmedium, n. g. = nicht getestet.

Isolat <i>H. p.</i>	Medium	Wachstum <i>C. fusca</i>	Samen <i>A. stolonifera</i>	Blattsegmenttest <i>F. excelsior</i>	Samen <i>F. excelsior</i>	Samen <i>O. basilicum</i>
		Hemmung [mm]	Keimung [%]	Schädigungsgrad [%]	Keimung [%]	Keimung [%]
C 403	BM	0	10	9,9	4,3	80
C 411	BM	0	3	6,7	20,8	0
C 415	BM	0	5	9,3	33,3	0
C 421	BM	0	3	5,7	25,0	0
C 428	BM	0	0	6,7	29,2	0
C 429	BM	0	28	5,8	41,7	100
C 434	BM	0	0	9,2	25,0	0
C 442	BM	0	15	8,1	29,2	0
C 444	BM	WH 7	0	13,8	20,8	0
C 448	BM	0	0	3,9	23,8	0
C 454	BM	0	3	11,3	25,0	0
C 468	BM	WH 7	0	12,6	37,5	10
C 472	BM	0	33	5,5	33,3	60
C 480	BM	0	0	9,3	12,5	0
C 489	BM	WH 10	0	16,5	4,2	0
C 492	BM	0	0	17,0	62,5	5
C 502	BM	0	8	5,9	70,0	85
C 509	BM	WH 8	0	18,8	29,2	0
EL 120	BM	n. g.	n. g.	0	78,9	80

In der Summe aller Werte beider Tests (Blattsegmenttest und Samenauskeimtest von *F. e.*) gibt es nach Pearson eine gute Korrelation ($P = 0,89$), so dass beide

Methoden gute Indikatoren zur Untersuchung der Kulturextrakte hinsichtlich der enthaltenen Virulenzfaktoren darstellen. Vergleicht man die Ergebnisse der Hemm- bzw. Auskeimtests der Organismen *C. fusca* und *A. stolonifera* mit dem Auskeimtest der Eschensamen, so wird deutlich, dass es hier kaum Übereinstimmung in Bezug auf Wachstums- oder Keimungshemmung in Anwesenheit der verschiedenen Kulturextrakte gibt (Tab. 5.1, rote Umrandungen), was sich auch in den Korrelationswerten von $P = -0,43$ bzw. $0,15$ widerspiegelt (Tab. 5.2). Ebenso gibt es keine gute Korrelation zwischen dem Auskeimtest der Eschensamen und den Basilikumsamen einer Pflanze, die relativ nahe mit Eschen verwandten ist ($P = 0,46$). Hieraus kann man schließen, dass die von *H. p.* sezernierten Sekundärmetabolite relativ wirtsspezifisch sind und keinen vergleichbaren Einfluss auf die Auskeimfähigkeit oder das Wachstum, selbst in der gleichen Ordnung stehender Organismen haben. Der Auskeimtest mit Basilikumsamen stellt demnach keine Alternative zum Auskeimtest mit Eschensamen dar. Im Weiteren eignen sich in diesem Fall die Kulturextrakttests mit wirtsfremden Organismen nicht, da sie keine Aussage über die Variabilität der Virulenz in Bezug auf die Esche zulassen.

Fazit: Zur Testung der Aktivität der Sekundärmetabolite in den Kulturextrakten gegen *F. excelsior*, sollte *F. excelsior* als Testorganismus verwendet werden.

Tabelle 5.2: Korrelationskoeffizienten nach Pearson der Pilzkulturextrakttests. $P = 1$ positive Korrelation, $P = -1$ negative Korrelation, $P = 0$ keine Korrelation, rot = Werte mit guter Korrelation.

Test Kulturextrakte	Wachstum <i>C. fusca</i>	Samen- keimung <i>A. stolonifera</i>	Blattsegment- test <i>F. excelsior</i>	Samen- keimung <i>F. excelsior</i>	Samen- keimung <i>O. basilicum</i>
Wachstum <i>C. fusca</i>		-0,44	0,73	-0,43	0,41
Samen- keimung <i>A. stolonifera</i>			-0,50	0,15	0,71
Blattsegment- test <i>F. excelsior</i>				-0,89	-0,46
Samen- keimung <i>F. excelsior</i>					0,46
Samen- keimung <i>O. basilicum</i>					

Die Zusammensetzung und die damit verbundene Identifizierung der Virulenzfaktoren konnte im Laufe der Arbeit nicht mehr analysiert werden, findet aber derzeit im Rahmen von Kooperationen mit verschiedenen Arbeitsgruppen statt (AG Jeroen Dickschat, TU Braunschweig; AG Rainer Ebel, Universität Aberdeen, UK; AG Marc Stadler, HZI, Braunschweig).

Im Zuge dessen wurde allerdings speziell nach einem bereits bekannten Metabolit gesucht. Dabei handelt es sich um eine auch von anderen Pilzen wie *Gliocladium virens* und *Trichoderma hamatum* produzierte steroid-ähnliche Substanz, dem Phytotoxin Viridiol (Moffatt et al., 1969, Wipf und Kerekes, 2003)(Abb. 5.1), welche

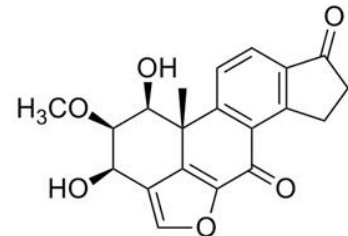


Abbildung 5.1: Struktur von Viridiol (Andersson et al., 2013)

bekanntlich auch von *H. p.* synthetisiert werden kann (Andersson et al., 2010). Unbekannt war allerdings, ob diese Substanz von allen Isolaten der Art produziert wird und auch nicht, ob *H. a.* Viridiol synthetisieren kann. Die Analyse hat ergeben, dass die meisten der untersuchten *H. p.* - Isolate das Phytotoxin Viridiol produzieren (Tabelle 4.3). Dabei ist anzumerken, dass auch die anderen untersuchten Isolate fähig sein könnten das Metabolit zu produzieren, jedoch unter der Nachweisgrenze (persönliche Mitteilung R. Ebel). Die Menge des gemessenen Viridiol variierte beträchtlich zwischen 0,02 µg/mg Extrakt und 132 µg/mg Extrakt. In die Untersuchungen wurden auch Kulturextrakte der apathogenen Schwesterart *H. albidus* mit einbezogen. Umso erstaunlicher war es, den größten Viridiolgehalt im Kulturextrakt eines Isolates von *H. albidus* (090812.3a) zu messen. Dies war die 6600fache Menge im Vergleich zur geringsten Messung im Extrakt von Isolat C 489, ein Stamm der virulenten Art *H. pseudoalbidus*. Darüber hinaus konnten in vier weiteren Kulturextrakten von Isolaten von *H. a.* Viridiol, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen (0,08-1,41 µg/mg Extrakt), detektiert werden. Damit obliegt es nicht der virulenten Art *H. p.* allein, dieses Phytotoxin zu produzieren.

Die Tatsache das Andersson et al., (2010) in Untersuchungen an Eschenblättern, benetzt mit reinem Viridiol, die Ausbildung von Nekrosen beobachtete, widersprach den Messungen zum Viridiolgehalt in den eigenen Kulturextrakten. Denn folglich müsste auch *H. albidus* in der Lage sein, Nekrosen an Blättern hervor zu rufen, nur wurde dies bisher noch nicht beobachtet oder gezielt untersucht. Vor diesem Hintergrund wurde der Blattsegmenttest (Kap. 4.8.2.3) um fünf Kulturextrakte

verschiedener Isolate von *H. a.* erweitert, mit dem Ergebnis, dass keiner dieser Extrakte Nekrosen oder sonstige Schädigungen an den Blättern hervor rief (Abb. 4.36). Im Vergleich dazu wiesen die Blätter, welche beispielsweise mit dem Kulturextrakt von C 489 behandelt wurden, starke Nekrosen entlang der Mittelrippe und am Blattstiel selbst auf, woraufhin es sogar zum Blattabfall kam (Abb. 4.36). Im Vergleich zu der aufgetragenen Menge bei Andersson et al. (2010), die bei 0,12 µg reinem Viridiol lag, verursachte die in diesem Blattsegmenttest eingesetzte Menge von 1 mg Viridiol, enthalten im Pilzextraktgemisch, keinerlei Schäden. Trotzdem zeigten frühere Untersuchungen mit Viridiol und beispielsweise Amarantsamen die phytotoxische Aktivität dieser Substanz während der Keimung der Samen. Infolge der Behandlung mit Viridiol verkümmerten die Samen und es kam zur Nekrosenbildung an den Keimwurzeln (Howell und Stipanovic, 1984).

Es wurde davon ausgegangen, dass es sich bei Viridiol um einen wichtigen Virulenzfaktor handelt, verantwortlich für die an Blättern nach erfolgter Infektion entstandenen Nekrosen (Andersson et al., 2010, Kowalski und Kraj, 2009). Diese Studien belegen aber, das Viridiol, wenn dann nicht allein dafür verantwortlich ist und eventuell nur in Kombination mit anderen Sekundärstoffen ein virulentes Potential hat. Dies bestätigen auch die Korrelationsprüfungen der Viridiolkonzentration mit den Ergebnissen der Kulturextrakttests (Tab. 5.3), nach dem in keinem der Fälle eine Korrelation nachgewiesen werden konnte. Kowalski und Kraj (2009) postulierten, Viridiol könne die Funktion haben, die ökologische Nische zu sichern, ausgehend von dessen toxischer Wirkung (Howell und Stipanovic, 1984). Bisher wurde allerdings nur gezeigt, dass von der Vorstufe Viridin eine Aktivität gegen andere Pilze ausgeht (Brian und McGowan, 1945), was erforderlich ist, um einen bestimmten Lebensraum zu beanspruchen. In Bioassays mit Viridiol hingegen zeigte die Substanz selbst in einer Konzentration von 1000 µg/mL keine Aktivität gegen andere Pilze oder Bakterien (Howell und Stipanovic, 1984).

Tabelle 5.3: Korrelationskoeffizienten nach Pearson der Viridiolkonzentration und der Pilzkulturextrakttests. P = 1 positive Korrelation, P = -1 negative Korrelation, P = 0 keine Korrelation.

Test Kulturextrakte	Wachstum <i>C. fusca</i>	Samen- keimung <i>A. stolonifera</i>	Blattsegment- test <i>F. excelsior</i>	Samen- keimung <i>F. excelsior</i>	Samen- keimung <i>O. basilicum</i>
Viridiol- konzentration	0,19	-0,37	-0,20	0,15	-0,53

In Folgearbeiten konnten Andersson et al. (2013) weitere Substanzen aus *H. p.* Isolaten isolieren, die zur Gruppe der Furanosteroide gehörten. In Bioassays mit 2 Wochen alten Sämlingen und einjährigen Pflanzen wurden keine Nekrosen beobachtet, daraus schließend, dass diese Stoffe keine Rolle in der Phytotoxis spielen.

In diesem Zusammenhang wurde auch diskutiert, inwieweit es Substanzen gibt, die zwar vom Pathogen produziert werden, aber nicht in Kulturextrakten nachweisbar sind, da sie beispielsweise nicht ins Kulturmedium hinein diffundieren. Hierfür kam uns die Methodik (Kap. 3.13) eines Kooperationspartners (AG Jeroen Dickschat, TU Braunschweig) zugute, mit deren Anwendung flüchtige, also in die Umwelt abgegebene Substanzen, nachgewiesen werden können (Dickschat et al., 2005). Die sogenannte CLSA-Analyse identifizierte von verschiedenen Isolaten von *H. p.* diverse Substanzen, die in die Stoffgruppe der Laktone eingeordnet wurden (Abb. 5.2).

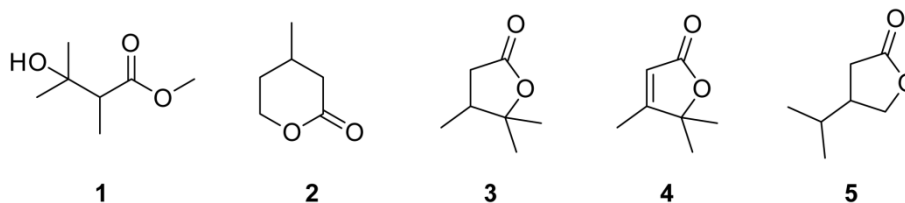


Abbildung 5.2 Laktone isoliert aus verschiedenen Isolaten von *H. p.*

In darauf folgenden Auskeimtests mit Eschensamen (Kap. 4.8.1), wurde ihre Virulenz untersucht, welche zeigten, dass alle fünf Substanzen die Auskeimung der Samen um mindestens 40% reduzierten. Ein Lakton zeigte eine so stark Hemmung, wie sie nicht einmal bei den Kulturextrakten vorkam. Diese neuen Strukturen und die nachgewiesene Virulenz gegenüber der Auskeimung von Eschensamen sind ein neuer Ansatz, bei der Suche nach möglichen Virulenzfaktoren, neben der Analyse von Pilzkulturextrakten und der Identifizierung und Quantifizierung von Exoenzymen.

5.6 Variabilität der Virulenz

Parallel zu den Untersuchungen zur Diversität der Morphologie, Biochemie und des Sekundärstoffwechsels fanden auch *in planta* Infektionsstudien statt. Damit sollte überprüft werden, ob sich die Isolate nicht nur makroskopisch und in der

Sezernierung von Exoenzymen unterscheiden, sondern auch in ihrer Virulenz gegenüber Eschenpflanzen.

Mit der Infektion von *H. pseudoalbidus* an Eschen sollte der direkte Einfluss des Erregers auf die Wirtspflanze untersucht werden. Hierzu wurden junge Eschen unter sterilen Bedingungen in Gläsern mit definiertem Agarmedium und Kunststoffdeckel angezogen. Die Infektionen erfolgten mit Myzel der verschiedenen Isolate der anamorphen Form. Versuche die Sämlinge auch mit Ascosporen der Hauptfruchtform *H. pseudoalbidus* zu infizieren, gelangen aufgrund der unzureichenden Isolierbarkeit derselbigen nicht, als es auch nicht gelang, die Infektion unter sterilen Bedingungen zu etablieren. Ebenso erfolglos blieben Infektionen an Gewächshauspflanzen, aufgrund des zu großen Einflusses anderer pilzlicher und tierischer Organismen.

Im Vergleich zur Infektion der Eschensämlinge wurden Basilikumsämlinge als mögliche Testpflanzen infiziert. Basilikum kann viel zahlreicher kultiviert und infiziert werden, was den Umfang der Stichproben erhöhte. Zudem sind die Sämlinge leichter und schneller anzuziehen, da bei ihnen kein Brechen der Dormanz voraus ging. Die analogen Infektionen der beiden Pflanzenarten sollten darüber hinaus zeigen, ob sich die Isolate bezüglich ihrer Virulenz ähnlich verhalten und so die Infektionen mit Basilikum die mit Eschensämlingen für Virulenztests ersetzen könnten.

Sowohl die Infektion der Eschensämlinge, als auch von Basilikum zeigte klare Unterschiede in der Virulenz der verwendeten Isolate von *H. p.* (Tab. 5.4). Der Anteil an Eschen mit Chlorosen und Nekrosen lag zwischen 10 und 73%, einem relativ großen Unterschied zwischen der Virulenz der einzelnen Isolate von *H. p.* Besonders interessant ist, dass auch in diesem Test das Isolat C 502 eine sehr niedrige Virulenz zeigte, wie auch schon im Blattsegment- und Samenauskeimtest der Esche. Das Isolat EL 120, welches bisher ebenfalls wenig virulent war, führte in den Infektionsstudien bei nur 18% der Sämlinge zu Schädigungen. Im Vergleich dazu erwies sich C 489 erneut als sehr virulent. Es hemmte die Samenkeimung um 96% und führte beim Blattsegmenttest zu den meisten Nekrosen. Infolge der Infektion an Eschen kam es bei über 70% der Pflanzen zu Krankheitssymptomen und starken Schädigungen. Diese wiederkehrenden Beobachtungen manifestieren die Variabilität der Virulenz und unterstreichen die Aussagefähigkeit

vorangegangener Biotests. Im Vergleich zu den Infektionen mit Basilikum konnten ebenfalls Parallelen festgestellt werden. Grün unterlegt (Tab. 5.4) wurden die Isolate, die mit gleicher oder ähnlicher Virulenz (maximal 10% Differenz) an den Sämlingen Nekrosen und Chlorosen hervorriefen, immerhin 60% der Isolate. Nach Pearson gibt es in der Summe aller Werte sogar eine gute Korrelation zwischen den beiden Infektionsstudien von $P = 0,81$. Eine leichte Korrelation konnte zwischen den Infektionsstudien und dem Blattsegmenttest berechnet werden ($P = 0,67$). Dagegen konnte kein Wechselverhältnis zwischen Infektion an Eschensämlingen und dem Auskeimtest mit Kulturextrakten und Eschensamen gefunden werden ($P = -0,31$). Dies ist nicht überraschend, da es sich hier um zwei verschiedene Untersuchungsansätze handelt, zum einen Infektion mit Myzel und zum anderen Tests mit Kulturextrakten, wobei keiner der Tests den anderen ersetzen könnte.

Tabelle 5.4: Korrelationskoeffizienten nach Pearson der Infektion von axenischen Eschensämlingen verglichen mit der Infektion von Basilikumsämlingen und der Pilzkulturextrakttests gegen Blätter und Samen von *F. excelsior*. $P = 1$ positive Korrelation, $P = -1$ negative Korrelation, $P = 0$ keine Korrelation.

Virulenztest	Infektion axenischer Sämlinge <i>O. basilicum</i>	Kulturextrakttest Blattsegmente <i>F. excelsior</i>	Kulturextrakttest Samenkeimung <i>F. excelsior</i>	Viridiol-konzentration
Infektion axenischer Sämlinge <i>F. excelsior</i>	0,81	0,67	- 0,31	-0,22

Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen dem bisher als Virulenzfaktor eingestuftem Toxin Viridiol (Tab. 5.4 und 5.5) und den Infektionsstudien an Eschensämlingen festgestellt werden ($P = -0,22$). Dem ist hinzuzufügen, dass nicht bekannt ist, wie hoch die produzierte Menge Viridiol *in planta* war. Dazu wäre es sinnvoll, von erfolgreich infizierten Sämlingen die Viridiolmenge zu quantifizieren, in gleicher Weise wie es für die Kulturextrakte geschah. Es ist bekannt, dass die Produktion von Sekundärmetaboliten in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen sowie vom Entwicklungs- und Ernährungszustand des Pilzes gesteuert wird (Bu'Lock, 1975; Calvo et al., 2002), also variieren kann, je nachdem welchem Substrat sie ausgesetzt sind. Zumindest gibt es eine Übereinstimmung für das als äußerst gering bis nicht pathogen eingestufte Isolat C 502. Er produzierte wiederholt kein Viridiol in Kultur, unabhängig auf welchem Medium er kultiviert wurde (Daten nicht gezeigt) und zeigt kaum Virulenz, sei es in Form des Myzels, inokuliert in

Sämlinge, oder der in den Kulturextrakten enthaltenen Sekundärstoffe, getestet in Samenauskeimtests und auf Blattsegmenten der Esche.

Tabelle 5.5: Anteil der Chlorosen und Nekrosen an axenischen Eschen- und Basilikumsämlingen nach der Infektion mit verschiedenen Isolaten von *H. pseudoalbidus* (*H. p.*), daneben die gemessene Konzentration Viridiol im Pilzkulturextrakt. grün = geringer Anteil erkrankter Pflanzen, rot = hoher Anteil erkrankter Pflanzen, grün schattiertes Isolat = gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Infektionen.

Isolat <i>H. p.</i>	Anteil Pflanzen mit Chlorosen/Nekrosen [%]		µg Viridiol pro mg Pilzkulturextrakt
	Eschensämlinge	Basilikumsämlinge	
C 403	28	33	0
C 421	20	42	43,5
C 428	30	40	2,33
C 444	30	87	80,6
C 472	36	40	0
C 489	73	43	0,02
C 492	60	37	0,55
C 502	10	2	0
C 509	27	37	24,9
EL 120	18	18	3,82
Kontrolle	10	0	0

Ähnliche Infektionsversuche sind in zahlreichen Veröffentlichungen zu finden. Hierbei wurden junge Eschenpflanzen, im Gewächshaus künstlich mit einem Inokulum von *H. p.* infiziert und auf die Entstehung von Nekrosen an der Infektionsstelle bonitiert. Fokus der Untersuchungen waren aber nicht Unterschiede in der Virulenz der Isolate zu finden, vielmehr ging es um den Nachweis, dass *H. p.* eine pathogene Art ist, die die in der Natur beobachteten nekrotischen Veränderungen an Stämmen, Zweigen und Blättern hervorruft (u.a. Kirisits et al., 2008; Bakys et al., 2009; Kowalski und Holdenrieder, 2009a; Kowalski und Kraj, 2009; Kräutler und Kirisits, 2012; McKinney et al., 2012a). Demnach gibt es derzeit keine vergleichbaren Studien, die den gezeigten Ergebnisse widersprechen oder sie bestätigen könnten.

Dass *H. p.* die Eschensämlinge erfolgreich besiedelt hat, konnte mikroskopisch durch Anfertigung von Dünnschnitten nachgewiesen werden (Kap. 4.8.4). In den beispielhaft gezeigten Hellfeldaufnahmen wurden, durch entsprechendes Anfärben der Präparate, septierte Hyphen von *H. p.* in den Pflanzenzellen vom Wurzelgewebe visualisiert. Das zeigt, dass der Pathogen fähig ist, aktiv in die Pflanzenzellen einzudringen und so die Pflanze von innen her schädigen kann. Schon in früheren Arbeiten machten Schumacher (2007), Schumacher et al. (2009) und Sobczyk

(2009) darauf aufmerksam, dass der Pathogen bis ins Holz der Bäume vordringen und in den Leitungsbahnen Infektionen hervorrufen kann. Die dafür benötigten Exoenzyme (Matsubara und Iwasaki, 1972), wie Laccase und Peroxidase, ist er, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, in der Lage zu produzieren. Die Hyphen waren häufig im Splintholz zu finden, eher selten in den Wurzeln und gelegentlich in der Stammrinde. Besonders oft waren sie jedoch in axialen und paratrachealen Strahlengewebe zu lokalisieren, da diese Gewebe viele Fette und Stärke enthalten (Schumacher et al., 2009, Schumacher, 2011).

5.7 Hemmung von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*

Um nach einer Möglichkeit zur Bekämpfung oder Eindämmung eines Pathogens zu suchen, muss man sich die Strategien der Natur anschauen. Hier leben seit Jahrmillionen Organismen aus verschiedensten Bereichen zusammen. Ein Vorteil des Zusammenlebens ist, dass Pflanzen und Mikroorganismen sich so gegenseitig Schutz vor den unterschiedlichsten biotischen (Herbivoren, Pathogene) und abiotischen (Trockenheit, Nährstoffmangel) Faktoren bieten. Eine andere ausgeprägte Form der Beziehung zwischen Mikroorganismen und Pflanzen wurde bei der gut untersuchten Interaktion von Weidegräsern und Pilzen der Gattung *Epichloë* gefunden, wo das Zusammenleben der endophytischen Pilze mit ihrem Wirt zu dessen Schutz vor Fraßfeinden infolge der Produktion diverser Toxine seitens des Pilzes führt. Damit wird neben dem Schutz des Wirtes vor allem die Verbreitung des Endophyten mit Hilfe der Pflanze garantiert (Schardl und Clay, 1997; Justus, 2000; Malinowski und Belesky, 2000; Moon et al., 2004; Bayman, 2007). Dennoch, zu diesen Lebensgemeinschaften gehören auch andere höhere Pflanzen, welche mit Pilzen koexistieren ohne sich zu schaden und dabei sogar einen positiven Effekt ausüben (Haselwandter und Read, 1982; Fernando und Currah, 1996; Jumpponen et al., 1998; Römmert et al., 2002; Schulz et al., 2006; Deshmukh, 2007). Diese Pilze werden als Endophyten, das heißt, als in der Pflanze lebend, bezeichnet, eine Definition die von vielen nach heutigem Stand nur Mikroorganismen (also auch Bakterien) umfasst, die zeitweise oder ein Leben lang in gesundem Pflanzengewebe leben, ohne dabei Krankheitssymptome zu verursachen (Saikkonen et al., 1998; Maheshwary, 2006). Dabei kann es sich natürlich auch um latent pathogene Organismen handeln, die nur vorübergehend in

Abhängigkeit ihrer Wachstumsbedingungen (Wirtsalter, Substrat, klimatische Bedingungen) keine Krankheitssymptome auslösen (Schulz et al., 1999; Boyle et al., 2001). Es wurden aus Eschenmaterial 64 Endophyten unterschiedlicher Taxa isoliert (Kap. 3.2). Da es sich dabei um Pilze handelte, die bereits natürlicherweise in Eschen vorkamen, sollte überprüft werden, inwieweit sie in der Lage sind, das Wachstum des Anamorphs von *H. p.* zu hemmen. Deshalb wurden mit allen Endophyten einfache Dualkulturversuche durchgeführt (Kap. 3.19), die gezeigt haben, dass einige dieser Endophyten durchaus in der Lage waren, die getesteten *H. p.* - Stämme in Wachstum in Kultur einzuschränken. Die maximale Hemmleistung lag dabei bei 58% des normalen Wachstums der Kulturen. Dies liegt mitunter daran, dass Endophyten in der Regel schneller wachsen als *H. p.*, aber auch beim Erreichen der Myzelfront der *H. p.*- Isolate, war es dem Pathogen in keinem der Fälle möglich, den Endophyten zu überwachsen. Beste Hemmwirkung zeigten die Endophyten der Gattung *Phomopsis* sp. (9938), *Epicoccum nigrum* (9939), *Phoma* sp. (9942) aber auch *Nodulisporium* sp. (10049). Insgesamt hatten alle Endophyten eine antagonistische Wirkung gegenüber dem Pathogen, wobei oft auch die Endophyten selbst in ihrem Wachstum gehemmt wurden. Hierbei zeigten einzig die Isolate *Cladosporium* sp. und *Mycelia sterila*, dass die Gegenwart des Pathogens sie nicht in ihrer Entwicklung beeinflusste, sie aber wohl in der Lage waren, das Wachstum der *H. p.*- Isolate zu hemmen.

Inwieweit dies mit der Produktion bestimmter Metabolite, das heißt Abwehrstoffe, zusammenhängt, sollten Dünnschichtchromatographien (Kap. 3.11) der Kulturextrakte (Kap. 3.10), isoliert aus den Dual- und Monokulturen, zeigen. Dabei war auffällig, dass in den Kulturextrakten der Dualkulturen einige Banden, im Vergleich zur Monokultur, nicht mehr detektierbar waren. Da sie auch nicht in den Monokulturextrakten des Endophyten oder der Mediumkontrolle messbar waren, lässt dies darauf schließen, dass sie exklusiv vom Pathogen gebildet, jedoch in Kultur mit dem Endophyten nicht mehr sezerniert wurden. Im Weiteren ist es möglich, dass der Pathogen noch in der Lage war, den Sekundärstoff zu produzieren, aber es vom Endophyten zum Zeitpunkt der Messung schon abgebaut wurde. Beide Varianten lassen auf einen direkten Einfluss der Endophyten auf den Sekundärmetabolismus des Pathogens schließen, was sich *in planta* erst noch beweisen muss. *In vitro* Versuche können nur ein erster Anhaltspunkt sein, eignen sich indes aber

hervorragend für allgemeine, groß angelegte Screenings, um vorab mögliche Kandidaten für weiterführende Studien zu finden. Zur Aufklärung der Strukturen tragen gegenwärtig Kooperationspartner bei.

Neben der Analyse der Sekundärstoffe im Allgemeinen, war es nach den bereits zuvor gezeigten Untersuchungen zu Viridiol in Kulturextrakten von *H. p.* von großem Interesse, ob und wie sich die Produktion von Viridiol in den Dualkulturen verändern würde. Bemerkenswerter Weise kam es zu signifikanten Veränderungen des Viridiolgehalts in den Dualkulturextrakten. In allen Fällen konnte die in Monokultur gemessene Konzentration stark reduziert oder in 55% der Kulturextrakte sogar nicht mehr nachgewiesen werden. Damit zeigt sich erneut das Potential der endophytischen Pilze, nicht nur das Wachstum des Pathogens zu inhibieren, sondern auch die Sezernierung fremder Metabolite zu kontrollieren.

In weiterführenden Studien sollte nun *in planta* überprüft werden, ob die Endophyten auch im „natürlichen“ Habitat in der Lage sind, *H. p.*- Stämme entweder mit antifungischen Metaboliten zu hemmen und/oder die Eschensämlinge durch induzierte Resistenz toleranter gegen diesen Pathogen zu machen und sie so bei der Abwehr zu unterstützen, ohne ihnen zu schaden (Schulz et al., 2011). Dafür wurden axenische kultivierte Eschensämlinge mit den drei Endophyten 9938, 9939 und 9942 präinfiziert, da sie am aktivsten das Wachstum der *H. p.* - Isolate hemmten. Es stellte sich schnell heraus, dass auch die Endophyten bei einem Teil der Sämlinge Schädigungen hervorriefen, weshalb sie nicht für Folgeinfektionen mit dem Pathogen in Frage kamen. Einzig *Phomopsis* sp. (9938) hatte, trotz starken Wachstums im Kulturglas, keine äußerlich negativen Auswirkungen auf die Pflanzenentwicklung. Somit wurden diese Sämlinge weiter verwendet und mit einem Isolat (C403) von *H. p.* zusätzlich infiziert. Im Verlauf der Infektion mit dem Pathogen gab es leider keine Reduzierung der Krankheitssymptomatik der Sämlinge im Vergleich zur Infektion nur mit C 403. Wie auch die nur mit dem Pathogen infizierten Pflanzen, kam es zu Blattabfall infolge nekrotisierter Blätter und Sprosse. Immerhin wurden nie alle Blätter abgeworfen, dafür wuchs im Gegensatz zur Krankheitssymptomatik des Sprosses die Wurzel sehr gut. Letzteres könnte wiederum auf die Präinfektion mit dem Endophyten zurückzuführen sein. Endophyten können das Wachstum ihres Wirtes verbessern, um, im Falle der Wurzeln, die Nährstoffaufnahme zu verbessern (Maria und Sridhar, 2003; Schulz,

2006; Hipol, 2012). Interessant bei dieser Infektion war, dass bei der Inokulation nur mit dem Endophyten die Biomasse der Sämlinge um mehr als 58% erhöht wurde im Vergleich zu den Kontrollen. Diese enorme Steigerung und auch sonst positive Wirkung auf die gemessenen Parameter spricht dafür, dass 9938 sich normalerweise wie ein echter Mutualist gegenüber, und besonders innerhalb der Eschen verhält. Leider konnte bisher nicht gezeigt werden, dass 9938 in der Lage ist, die Sämlinge vor negativen Einflüssen durch die Infektion mit dem Pathogen zu schützen. Womöglich waren der Infektionsdruck in dem kleinen Kulturgefäß und die Konkurrenz um Nährstoffe, sowohl aus dem Medium, als auch innerhalb der Pflanze zu groß. Es ist nicht nachzuvollziehen, ob möglicherweise eine starke Interaktion zwischen Pathogen und Endophyt zu Ungunsten der Pflanzenvitalität verlief. Eine Analyse der ins Medium abgegebenen Metabolite könnte einen ersten Hinweis geben. Ebenso ein Screening der Pflanzen selbst, in Form einer Proteomanalyse, könnte zeigen, wie sich die Interaktion mit dem Endophyt und mit Endophyt und Pathogen auf genregulatorischer Ebene auswirkt (Bhadauria et al., 2010; Vincent et al., 2012).

Mit Hinblick auf die Resultate der Konfrontationstests und der Reduktion der Viridiolmenge in den Kulturextrakten der Dualkulturen von Endophyt und *H. p.*, sollte überprüft werden, wie die Kulturextrakte der Endophyten auf die Fruchtkörper von *H. p.* wirken. Durch direkte Applikation der Kulturextrakte auf Apothezien unterschiedlichen Alters, konnte eindrucksvoll die negative Wirkung auf die Vitalität der Fruchtkörper demonstriert werden. Innerhalb von 48 h waren über 95% der Apothezien abgestorben, infolge dessen keine Ascosporen mehr abgeschossen wurden. Im Weiteren konnte die Entstehung neuer Fruchtkörper nach Applikation von zwei der drei getesteten Kulturextrakte, 9939 und 9942, gänzlich unterbunden werden. Diese Untersuchungen an den Fruchtkörpern wurden mit konventionell erhältlichen Fungiziden erweitert, mit dem Resultat, dass die Fungizide Prosper® und Mirage® überwiegend hinter der Wirksamkeit der Kulturextrakte blieben. Dennoch wurden auch hier binnen weniger Tage, bei der größten Verdünnung, 80% der Fruchtkörper so stark geschädigt, dass es ihnen nicht mehr möglich war Ascosporen frei zu setzen. Von den Fungiziden erzielte Prosper®, verdünnt 1:10, die beste Hemmung, da es zu einer fast 100%igen Mortalität und 0% Fruktifikation neuer Apothezien kam. Zwar werden die beiden Mittel schon länger als Fungizide

eingesetzt, vor allem im Weinbau gegen Echten Mehltaubefall (Bayer CropScience) und im Getreideanbau zur Behandlung von verschiedenen Spross- und Blattkrankheiten (Makhteshim Agan Industries), aber es wurde bisher nicht getestet, ob sie auch die Entwicklung von *H. p.* beeinflussen.

Kalkstickstoff zu verwenden, kam durch ein Gespräch mit Jörg Schumacher, der Vorschlag, dieses sonst als Dünger und Verrottungshilfe eingesetzte Mittel (<http://www.alzchem.de>) in unserer Versuche mit einzubeziehen. Die 100% nekrotisierende Wirkung war beeindruckend, ebenso die Tatsache, dass weder neue Fruchtkörper entstanden, noch dass es länger als 24 h dauerte, bis alle Apothezien abgestorben waren. Neben guter Düngeeigenschaften, soll Kalkstickstoff auch dazu beitragen Krankheitserreger, Parasiten und andere Schädlinge im Boden abzuwehren (<http://www.alzchem.de>). Wang et al. (2007) setzten Kalkstickstoff erfolgreich in *in vitro* Versuchen gegen pathogene Pilze (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*) von Erdbeeren ein. Der Becherpilz *Sclerotinia sclerotiorum* ist ebenfalls ein Vertreter der Helotiales, wie *H. p.*, und verursacht aufgrund seines großen Wirtsspektrums zahlreicher Erkrankungen an landwirtschaftlich genutzten Pflanzen, wie Fäulnis an Bohnen und Raps. Die Bekämpfung der Apothezien mit einer Kalkstickstoffmischung zeigte ebenfalls eine wirkungsvolle Hemmung der Sklerotien- und Fruchtkörperentstehung (Huang et al., 2006).

In diesem Test gelang es eine Reihe hoch wirksamer Mittel/Substanzmischungen zu finden, die die Entwicklung und Reifung der Fruchtkörper von *H. pseudoalbidus* stark hemmen, was nicht letztlich dazu führt, das Ausschleudern der Ascosporen zu verhindern. In Anbetracht dessen, dass diese Mittel nicht exklusiv gegen den Erreger des Eschentriebsterbens wirken, sondern auch nützlich Pilzen, wie die Endophyten, aber auch die bislang als harmlos geltende Schwesterart zurückdrängen würden, kommt ein Einsatz in den Wäldern nicht in Betracht. Sie stellen aber eine Option für urbane Bäume in Alleen oder Parkanlagen dar, genauso wie für Baumschulen.

Die Effektivität mit der Kulturextrakte allgemein eingesetzt werden können zeigt sich in vielfältiger Weise. Messung zur Bioaktivität endophytischer Pilze aus der Purgiernuss (*Jatropha curcas*) zeigten nicht nur eine hohe Aktivität isolierter Endophyten in Dualkulturversuchen, sondern auch eine hohe Wirksamkeit des Kulturextraktes eines der Isolate (*Colletotrichum truncatum*) gegen pathogene Pilze

wie *Fusarium oxysporum* und *Sclerotinia sclerotiorum* (Kumar und Kaushik, 2013; Kumar et al., 2013). Andere Studien untersuchten Extrakte verschiedener Pflanzen, unter anderem vom Stachelmohn (*Argemone mexicana*), die eine akute toxische Wirkung gegen Mosquitolarven (*Culex quinquefasciatus*) aufwiesen (Karmegam et al., 1997). Ebenso ist das antagonistische Potential von mit marinen Schwämmen assoziierten Pilzen (Bsp. *Aspergillus clavatus*) bekannt, deren bioaktive Substanzen sich als wirksam gegen multiresistente Stämme wie *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *Candida* sp. zeigten (Manilal, 2010). Angedacht ist somit die Entwicklung eines Präparats, in dem wirksame Komponenten der Kulturextrakte der Endophyten für die Bekämpfung von *H. p.* eingesetzt werden.

Zusammenfassend:

Die Studien zur Morphologie, zu den Exoenzymen, den Sekundärmetaboliten, als auch zur Virulenz haben die große Heterogenität von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* gezeigt. So variabel phänotypisch die anamorphe Form in Kultur erscheint, so quantitativ unterschiedlich waren auch die Produktion von Exoenzymen und qualitativ divers die Sezernierung von Sekundärstoffen. Dabei war es unabhängig, von welchem Standort die Isolate stammten, wie schnell sie in Kultur wuchsen oder ob sie in der Lage waren das Phytotoxin Viridiol zu produzieren.

Die Variabilität der Virulenz gegenüber Eschen korreliert nicht bzw. im Fall des Exoenzyms Peroxidase nur wenig mit den untersuchten Faktoren (Tab. 5.6). In gleicher Weise gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Herkunft der Isolate, ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und ihres Phänotyps in Kultur. Die Bildung diverser Exoenzyme durch *H. p.* korreliert ebenso wenig mit der Herkunft, der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Phänotyp von *H. p.*, wie auch mit der Virulenz der Isolate gegenüber axenischen Eschensämlingen.

Tabelle 5.6: Korrelationskoeffizienten nach Pearson zwischen den Ergebnissen der Viridiolkonzentration, der Exoenzymtests und Kultureigenschaften sowie Herkunft von *H. pseudoalbidus* (*H. p.*), als auch der Infektion axenischer Eschensämlinge. rot - leichte Korrelation; P = 1 positive Korrelation, P = -1 negative Korrelation, P = 0 keine Korrelation.

Parameter von <i>H. p.</i>	Herkunft	Wachstumsgeschwindigkeit in Kultur auf KM-Agar	Phänotyp auf KM-Agar	Infektion axenischer Sämlinge
Konzentration Viridiol	-0,33	-0,06	0,36	-0,22
Cellulase	-0,07	0,16	0,16	-0,27
β-Glucosidase	-0,33	0,20	0,34	-0,44
Laccase	-0,06	-0,27	-0,17	-0,29
Peroxidase	0,22	-0,54	-0,63	0,73
Polyphenoloxidase	0	0,22	-0,55	0,43
Tyrosinase	-0,33	-0,40	0,08	-0,12
Amylase	-0,32	0	0,19	-0,53
Lipase	-0,06	-0,27	-0,17	0,32
Herkunft		- 0,27	0,55	0,27
Wachstums- geschwindigkeit in Kultur auf KM-Agar			0,08	-0,22
Phänotyp auf KM- Agar				-0,52

Die Untersuchungen zu den Endophyten, ob in Dualkultur, in Infektionsstudien mit der Esche oder den Kulturextrakten, lieferten neue und interessante Erkenntnisse. Es gibt Endophyten, die das Wachstum der Isolate von *H. p.* *in vitro* hemmen, die Entwicklung von Eschensämlingen fördern und deren Sekundärstoffe potent sind, die Fruktifikation der Apothezien zu unterbinden. Zugleich scheint noch kein geeigneter Endophyt gefunden zu sein, der neben wachstumsfördernden Eigenschaften auch fähig ist, die Toleranz der Eschen gegenüber dem Pathogen zu erhöhen oder diesen daran hindern, sich in der Pflanze auszubreiten. Die große Anzahl der isolierten Endophyten lässt jedoch hoffen, doch noch einen geeigneten Vertreter finden zu können. Einen neuen Ansatz gegen die Apothezien von *Hymenoscyphus pseudoalbidus* bieten im begrenzten Umfang die Verwendung der Kulturextrakte, bzw. deren aktiven Inhaltsstoffe, sowie alternativ auch die bereits in Anwendung stehenden Fungizide, als auch Kalkstickstoff.

6. Ausblick

Vorschläge zu weiterführenden Arbeiten zum Verständnis und zur Bekämpfung von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, dem Verursacher des Eschentriebsterbens:

- ✱ Weitere Überprüfungen der Virulenz von *H. pseudoalbidus* durch Infektionen an axenischen Eschensämlingen, um weitere apathogene Stämme zu identifizieren.
- ✱ Überprüfung der apathogenen Stämmen oder der Stämme mit verminderter Virulenz auf das Vorhandensein von Viren, verantwortlich für die Hypovirulenz.
- ✱ Test von hypovirulenten Stämmen auf ihr Potenzial die Hypovirulenz auf andere Stämme zu übertragen.
- ✱ Übertragung der *in vitro* Versuche mit axenischen Sämlingen auf Pflanzen im Gewächshaus unter natürlicheren Bedingungen.
- ✱ Infektionen an Basilikumpflanzen, aufgrund der gemeinsamen Familienzugehörigkeit und guten Korrelation mit den Escheninfektionen, als schnellen Virulenztest etablieren.
- ✱ Die genetische Variabilität der Isolate untersuchen.
- ✱ Erkenntnisse über das Maß der physiologischen Schädigung erkrankter Eschen erhalten.
- ✱ Nach weiteren für die Esche unschädlichen und *H. pseudoalbidus* hemmenden Pilzendophyten suchen, der die Symptomatik bzw. Entwicklung der Krankheit reduziert. Ein solcher Endophyt könnte zur biologischen Bekämpfung eingesetzt werden.
- ✱ Ausweitungen der Tests unter kontrollierten Bedingungen zur Kontrolle der Apothezienentwicklung mittels Kalkstickstoff und Ermittlung der minimal erforderlichen Konzentration.
- ✱ Identifizierung der gegen *H. pseudoalbidus* wirksamen Substanzen in den Kulturextrakten der Pilzendophyten.
- ✱ Identifizierung der in Dualkultur produzierten Metabolite seitens der Pilzendophyten.

8. Literaturverzeichnis

- Agrios, G.N., (1997): Plant Pathology. Academic Press, San Diego, New York.
- Alexopolus, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996): Introductory Mycology, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Amann, G. (2011): Bäume und Sträucher des Waldes. 20. Auflage. Verlag J. Neumann-Neudamm KG, Melsungen.
- Andersson, P. F.; Johansson, S. B. K.; Stenlid, J.; Broberg, A., (2010): Isolation, identification and necrotic activity of viridiol from *Chalara fraxinea*, the fungus responsible for dieback of ash. Forest Pathology 40: 43-46.
- Andersson, P.F.; Bengtsson, S.; Cleary, M.; Stenlid, J.; Broberg, A. (2013): Viridin-like steroids from *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Phytochem., 86, 195-200.
- Bakys, R.; Vasaitis, R.; Barklund, P.; Ihrmark, K.; Stenlid, J., (2009): Investigations concerning the role of *Chalara fraxinea* in declining *Fraxinus excelsior*. Plant Pathology 58: 284-292.
- Bakys, R., Vasiliauskas, A., Ihrmark, K., Stenlid, J., Menkis, A., Vasaitis, R. (2011): Root rot, associated fungi and their impact on health condition of declining *Fraxinus excelsior* stands in Lithuania. Scand. J. For. Res. 26, 128–135.
- Baral, H.O. (1987): Der Apikalapparat der Helotiales, eine lichtmikroskopische Studie über Arten mit Amyloidring. Z. Mykol. 53, 119-135.
- Barklund, P., (2005): Ash dieback takes over south and mid-Sweden. Skogs Eko 3, 11–13 (in Swedish).
- Bavendamm, W. (1928): Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 38: 257-276.
- Bayman, P. (2007): Fungal endophytes. In: The mycota IV environmental and microbial relationships, 2nd edition, Vol Eds: Kubicek, C.P. & Druzhinina I.S., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 213-227.
- Bellemère, A. (1967): Contribution a l'étude du développement de l'apothecie chez discomycetes inoperculés. Bull. Soc. Mycol. France 83: 395-931. As cited by Kimbrough, J.W., 1981: The Discomycete Centrum in Ascomycete Systematics – The Luttrellian Concept. Ed. by Reynolds, D.R. New York, Heidelberg, Berlin: Springer Verlag. pp. 92-101.
- Bengtsson, S.B.K., Vasaitis, R., Kirisits, T., Solheim, H., Stenlid, J. (2012): Population structure of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* and its genetic relationship to *Hymenoscyphus albidus*. Fung. Ecol. 5, 147–153.
- Bhadauria V., Banniza, S., Wang, L., X., Wei, Y., D., Peng, Y., L. (2010): Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with host. Eur. J. Plant Pathol. 126: 81-95.

- Björkman, I. (1960): Experiments with cereal rusts on detached leaves in benzimidazole. *Botanisk Not.* 113: 82-86.
- Booth, C. (1971): *Methods in microbiology*. Volume 4, Academic Press Inc. (London) LTD: 83.
- Boyle, C., Götz, M., Dammann-Tugend, U. & Schulz, B. (2001): Endophyte – host interactions III. Local vs. Systemic colonization. *Symbiosis* 31, 259-281.
- Breitenbach, J. & Kränzlin, F. (1981): *Pilze der Schweiz, Band 1 Ascomyceten (Schlauchpilze)*. Luzern: Mykologia.
- Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J. W., Neuhaus, G., Sonnewald, U. (2008): *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*, Heidelberg: Spektrum Verlag.
- Brian, P. W. & McGowan, J. C. (1945): Viridin: a highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. *Nature*, 156 (3953), 144-145.
- Bu'Lock, J.D. (1975): Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. *The filamentous fungi, Industrial Mycology Vol.1*, 33-58.
- Butin, H. (1986): *Krankheiten der Wald- und Parkbäume*. Stuttgart, New York, Thieme Verlag
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. & Keller, N.P. (2002): Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 66 No. 3, 447-459.
- Carroll, G.C.; Wicklow, D.T. (1992): *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem*, 2. Auflage. Dekker, New York, 976 S.
- Cazes, J., (2001): Detection (Visualization) of TLC Zones. In *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker Inc.: 248-251.
- Cech, T. L., (2006): Eschenschäden in Österreich. *Forstschutz Aktuell* 37, 18–20.
- Cech, T.L. & Hoyer-Tomiczek, U., (2007): Aktuelle Situation des Zurücksterbens der Esche in Österreich. *Forstschutz Aktuell* 40: 8-10.
- Chandelier, A.; André, F.; Laurent, F., (2010): Detection of *Chalara fraxinea* in common ash (*Fraxinus excelsior*) using real time PCR. *Forest Pathology* 40 (2), 87-95.
- Chandelier, A., Delhay, N., Helson, M. (2011): First report of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (Anamorph *Chalara fraxinea*) on *Fraxinus excelsior* in Belgium. *Plant Dis.* 95, 220.
- Chin, K. M.; Chavillaz, D.; Kaesbohrer, M.; Staub, T. & Felsenstein, F. G. (2001): Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* to strobilurins. *Crop Protection* 20: 87-96.
- Cleary, M. R., Arhipova, N., Gaitnieks, T., Stenlid, J., & Vasaitis, R. (2012): Natural infection of *Fraxinus excelsior* seeds by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology* 43 (1): 83-85.
- Claessens, H., Pauwels, D., Thibaut, A., Rondeux J. (1999): Site index curves and autecology of ash, sycamore and cherry in Wallonia (Southern Belgium). *Forestry* 72:171–182.

- Collin, P. & Badot, P. M. (1997): Le point des connaissances relatives a la croissance et au developpement du Frêne commun (*Fraxinus excelsior* L.). Acta botanica gallica, 144(2), 253-267.
- Demain, A.L. und Fang, A. (2000): The natural functions of secondary metabolites. Adv. Biochem. Eng/Biotech. 33: 486-498.
- Dennis, R.W.G. (1956): A revision of the British Helotiaceae in the Herbarium of The Royal Botanic Gardens, Kew, with notes on related European species, Mycol. Pap. 62, 93-94.
- Dennis, R.W.G. (1964): Remarks on the genus *Hymenoscyphus* S.F. Gray with observations on sundry species referred by Saccardo and others to the genera *Helotium*, *Pezizella* or *Phialea*. Persoonia 3, 29-80.
- Dennis, R.W.G., 1981: British Ascomycetes, revised edn. Vaduz: J. Cramer.
- Deshmukh, S.D. (2007): Molecular and cytological investigations of the fungal endophyte *Piriformospora indica* and its interactions with the crop plant barley. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Desmazières, J.B.H.J. (1851): Dix-neuvième notice sur les plantes cryptogames récemment découvertes en France. Ann. Sc. Nat., III 16, 323-324.
- Diekmann, M. (1994): Deciduous forest vegetation in Boreo-nemoral Scandinavia. Acta Phytogeogr Suec 80:3–112.
- Dickschat, J.S.; Martens, T.; Brinkhoff, T.; Simon, M. & Schulz, S. (2005): Volatiles Released by a *Streptomyces* Species Isolated from the North Sea. Chem Biodivers 2: 837-65.
- Douglas, G., C. und Ryan, C. (2012): Situation with ash in Ireland: stand characteristics, health condition, ongoing work and research needs. Report on 1st MC Meeting, COST Action FP1103 Fraxback, in Vilnius, Litauen.
- Dumont, K.P. (1981): The Leotiaceae III. Notes on selected temperate species referred to *Helotium* and *Hymenoscyphus*. Mycotaxon 13, 59-84.
- Ellis, M.B. & Ellis, J.P. (1985): Microfungi on Land Plants: An Identification Handbook. London and Sydney: Croom Helm.
- Esser, K. (2000): Kryptogamen 1: Cyanobakterien Algen Pilze Flechten Praktikum und Lehrbuch (Vol. 1). Springer Verlag.
- Engesser, R.; Quelo, V.; Meier, F.; Kowalski, T. & Holdenrieder, O. (2009): Das Triebsterben der Eschen in der Schweiz. Wald und Holz 6/09: 24-27.
- EPPO: http://www.eppo.org/QUARANTINE/Alert_List/fungi/Chalara_fraxinea.htm
- Erb, W. & Böhle, E. (2009): Dünnschichtchromatographische Untersuchungen der Faeces-Lipide Methodik und Untersuchungsbefunde bei gesunden Probanden. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 6 (5): 379-383.
- Falbe, J. & Regitz, M.,(1996): RÖMPP Lexikon der Chemie; 10. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Falinski, J. B., & Falinska, K. (1986): Vegetation dynamics in temperate lowland primeval forests: ecological studies in Bialowieza Forest. Dordrecht: Dr. W. Junk.

- Felsenstein, F. G.; Park, R. F. & Zeller, F. J. (1998): The use of detached seedling leaves of *Triticum aestivum* to study pathogenicity in *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*. *Journal of Phytopathology* 146: 115-121.
- Fernando, A.A. & Currah, R.S. (1996): A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Can J Bot* 74, 1071-1078.
- Fremstad, E. (1983): Role of black alder (*Alnus glutinosa*) in vegetation dynamics in West Norway. *Nordic Journal of Botany*, 3(3), 393-410.
- Goudet, M., Piou, D. (2012): La chalarose du frêne. Que sait-on? *Rev. For. Fr.* 64, 27-40.
- Grad, B.; Kowalski, T.; Kraj, W., (2009): Studies on secondary metabolite produced by *Chalara fraxinea* and its phytotoxic influence on *Fraxinus excelsior*. *Phytopathologia* 54: 61-69.
- Griffin, D. H. (1994): *Fungal physiology*. Wiley-Liss.
- Grime, J.P. (1979): *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 222 pp.
- Gross, A., Grunig, C.R., Queloz, V., Holdenrieder, O., (2012a): A molecular toolkit for population genetic investigations of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *For. Pathol.* 42, 252-264.
- Gross, A., Zaffarano, P.L., Duo, A. & Grünig, C.R., (2012b): Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(12), pp.977-986.
- Halmschlager, E. & Kirisits, T., (2008): First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. *Plant Pathol.* 57: 1177-1177.
- Haselwandter, K. & Read, D.J. (1982): The significance of root-fungus association in two *Carex* species of high-alpine plant communities. *Oecologia* 53, 352-354.
- Heiniger, U., & Rigling, D. (1994): Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, 32(1), 581-599.
- Hipol, R., M. (2012): Molecular identification and phylogenetic affinity of two growth promoting fungal endophytes of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam) from Baguio City, Philippines. *Electronic Journal of Biology*, Vol. 8 (3): 57-61.
- Honey, E.E. (1928): The monilioid species of *Sclerotinia*. *Mycologia* 20, 127-157.
- Hora, F. B. (1981): *Bäume der Welt - Oxford Enzyklopädie*. Stuttgart, DRW-Verlag.
- Horst, R., K. (2008): *Westcott's Plant Disease Handbook*, Springer Verlag.
- Hulme, P. E. & Borelli, T. (1999): Variability in post-dispersal seed predation in deciduous woodland: relative importance of location, seed species, burial and density. *Plant Ecology*, 145(1), 149-156.

- Hulme, P.E. & Hunt, M. (1999): Rodent post-dispersal seed predation in deciduous woodland: predator response to absolute and relative abundance of prey. *Journal of Animal Ecology*, 68(2), 417-428.
- Husson, C.; Scala, B.; Caël, O.; Frey, P.; Feau, N.; Marçais, B. (2011): *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *Eur. J. Plant Pathol.*, 130, 311-324.
- Husson, C., Caël, O., Grandjean, J.P., Nageleisen, L.M. & Marçais, B. (2012): Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathology*, 61(5), pp.889–895.
- Ioos, R., Kowalski, T., Husson, C., Holdenrieder, O. (2009): Rapid *in planta* detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 329–335.
- Ioos, R., Fourrier, C. (2011): Validation and accreditation of a duplex real-time PCR test for reliable *in planta* detection of *Chalara fraxinea*. *EPPO Bull.* 41, 21–26.
- Jankovsky, L., Palovciková, D., Dvorák, M. (2008): Alien disease of woody plants in the Czech Republic. *FS-aktuell* 44: 32–34.
- Johansson, S.B.K.; Vasaitis, R.; Ihrmark, K.; Barklund, P.; Stendlid, J. (2010): Detection of *Chalara fraxinea* from tissue of *Fraxinus excelsior* using species-specific ITS primers. *For. Path.* 40, 111-115.
- Jumpponen, A., Mattson, K.G. & Trappe, J.M. (1998): Mycorrhizal functioning of *Phialocephala fortinii*: interactions with soil nitrogen and organic matter. *Mycorrhiza* 7, 261-265.
- Justus, M. (2000): Untersuchungen zur Physiologie und Biochemie von Lolinalkaloiden in der *Festuca pratensis* / *Neotyphodium uncinatum*-Assoziation. Dissertation, TU Braunschweig
- Karmegam, N., Sakthivadivel, M., Anuradha, V., Thilagavathy, D. (1997): Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. *Bioresource Technology*, Volume 59, Issues 2–3: 137–140.
- Kimbrough, J.W.; Atkinson, M. (1972): Common features and imperfect stage of *Hymenoscyphus caudata*. *Am. J. Bot.* 59, 165-171.
- Kimbrough, J.W., (1981): The Discomycete Centrum in Ascomycete Systematics – The Luttrellian
- Kirisits, T. (2008): Eschenpathogen *Chalara fraxinea* nun auch in Kärnten nachgewiesen. *Forstschutz Aktuell* 45: 28-30.
- Kirisits, T.; Matlakova, M.; Mottinger-Kroupa, S.; Halmschlager, E., (2008): Involvement of *Chalara fraxinea* in ash dieback in Austria. *Forstschutz Aktuell* 44: 16-18.
- Kirisits, T. & Cech, T.L. (2009): Beobachtungen zum sexuellen Stadium des Eschentriebsterben-Erregers *Chalara fraxinea* in Österreich. *Forstschutz-Aktuell* 48: 21-25.
- Kirisits, T. (2010): Krankheitserreger ist neue Pilzart. *Forstzeitung* 05/2010: 30.
- Kirisits, T. (2011a): Eschentriebsterben in Vorarlberg und Tirol. *Forstschutz Aktuell* 51, 14–18.

- Kirisits, T., (2011b): Österreich weites Eschentriebsterben. Der Waldbauer, 06.06.11. <<http://www.der-waldbauer.at/?id=2500,4974030>>.
- Kirisits, T. & Cech, T.L. (2011): Eschentriebsterben in Baumschulen. Der Waldbauer, 21.4.11. <http://www.der-waldbauer.at/?id=2500%2C4960869%2C%2C>.
- Kirisits, T., Kritsch, P., Kräutler, K., Matlakova, M., Halmschlager, E. (2012): Ash dieback associated with *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in forest nurseries in Austria. J. Agr. Ext. Rural Dev. 4 (9), 230–235.
- Kirisits, T., Dämpfle, L., & Kräutler, K. (2013): *Hymenoscyphus albidus* is not associated with an anamorphic stage and displays slower growth than *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on agar media. *Forest Pathology*.
- Kjær, E.D., McKinney, L.V., Nielsen, L.R., Hansen, L.N., Hansen, J.K. (2012): Adaptive potential of ash (*Fraxinus excelsior*) populations against the novel emerging pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Evol. Appl.* 5, 219–228.
- Kowalski, T. (2006): *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* 36: 264–270.
- Kowalski, T. & Holdenrieder, O. (2008): Eine neue Pilzkrankheit an Esche in Europa. *Schweiz. Z. Forstwes.* 159, 45–50.
- Kowalski, T. & Kraj, W., (2009): Studies on secondary metabolite produced by *Chalara fraxinea* and its phytotoxic influence on *Fraxinus excelsior*. *Phytopathologia* 54: 61–69
- Kowalski, T. & Holdenrieder, O., (2009a): Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. *For. Pathol.* 39: 1–7.
- Kowalski, T. & Holdenrieder, O., (2009b): The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *For. Pathol.* 39: 304–308.
- Kowalski, T. & Bartnik, C. (2010): Morphological variation in colonies of *Chalara fraxinea* isolated from ash (*Fraxinus excelsior* L.) stems with symptoms of dieback and effects of temperature on colony growth and structure. *Acta Agrobot.* 63, 99–106.
- Krainsky, A. (1914): Die Aktinomyzeten und ihre Bedeutung in der Natur. *Zentrbl. f. Bakterien II Abt. Bd.* 41: 649.
- Kraj, W., Zarek, M., Kowalski, T. (2012): Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Mycol. Prog.* 11, 37–45.
- Kräutler, K. & Kirisits, T., (2012): The ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* is associated with leaf symptoms on ash species (*Fraxinus* spp.). *J. Agr. Ext. Rural Dev.* 4, 261–265.
- Krohn, K., Franke, C., Jones, P., Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B. (1992a): Isolierung, Synthese und biologische Wirkung von Coniothyriomycin sowie Synthese und Biotestung analoger offenkettiger Imide. *Liebigs Ann. Chem.*: 789–798.
- Krohn, K., Zia-Ullah, Hussain, H., Floerke, U., Schulz, B., Draeger, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Antus, S., Kurtán, T. (2007): Massarilactones E–G, New bioactive metabolites from the endophytic fungus *Coniothyrium* sp., associated with the Plant *Artemisia maritima*. *Chirality* 19: 464–470.

- Krohn, K., Michel, A., Roemer, E., Flörke, U., Aust, H. J., Draeger, S., Wray, V., Schulz, B. (1995): Biologically active secondary metabolites from fungi 6: Phomosines A-C. Three new biaryl ethers from *Phomopsis* sp. Nat. Prod. Lett. 6: 309-314.
- Krohn, K., Sohrab, M. H. K., Aust, H. J., Draeger, S., Schulz, B. (2004): Biologically active metabolites from fungi 19. New isocoumarins and highly substituted benzoic acids from the endophytic fungus, *Scytalidium* sp.. Nat. Prod. Res. 18: 277-285.
- Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P., Döring, D., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B. (1992b): Biological active metabolites from fungi. 2. An antifungal and herbicidal lanostane lactone from *Sporormiella australis*. Natural Products 1: 29-32.
- Kumar, S. & Kaushik, N. (2013): Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. PloS one, dx.plos.org
- Kumar, S., Kaushik, N., Proksch, P. (2013): Identification of antifungal principle in the solvent extract of an endophytic fungus *Chaetomium globosum* from *Withania somnifera*. SpringerPlus 2013, 2:37 doi:10.1186/2193-1801-2-37
- Lenz, H., Strasser, L., Petercord, R. (2012): Eschentriebsterben begünstigt Auftreten sekundärer Schadorganismen. Forstschutz Aktuell 54, 26–28.
- Lizon, P. (1992): The genus *Hymenoscyphus* (Helotiales) in Slovakia, Czechoslovakia. Mycotaxon 45, 1-59.
- Lorbeer, E., Mayr, M., Hausmann, B., Kratzl, K. (1984): Zur Identifizierung flüchtiger Substanzen aus biologischem Material mit Hilfe der CLSA (Closed Loop Stripping Apparatus). Monatshefte für Chemie (1984) 115, 107--1112
- Lösung, H. (2012): Einige Arten trotzen dem Eschensterben. TASPO Baumzeitung 04/2012, 25-27.
- Luschka, N. (1993): Die Pilze des Nationalpark Bayerischer Wald. Hoppea 53: 374 S.
- Lygis, V., Vasiliauskas, R., Larsson, K. H., Stenlid, J. (2005): Wood inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. Scand. J. For. Res. 20: 337–346.
- Lyr, H. (1958): Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion. Planta 50: 359-370.
- Maheshwari, R. (2006): What is an endophytic fungus? Current Science Vol. 90 No. 10, 1309.
- Malinowski, D.P. & Belesky, D.P. (2000): Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses. Crop Science 40, 923-940.
- Maria GL & Sridhar KR (2003): Endophytic fungal assemblage of two halophytes from west coast mangrove habitats, India. Czech, Mycol. 55:241–25.
- Marigo, G., Peltier, J. P., Girel, J., Pautou, G. (2000): Success in the demographic expansion of *Fraxinus excelsior* L. Trees, 15(1), 1-13.
- Matsubara, T. & Iwasaki, H. (1972): Occurrence of Laccase and Tyrosinase in Fungi of Agaricales and comparative study of Laccase from *Russula delica* and *Russula pseudodelica*. Bot. Mag. Tokyo 85: 71-83.

- Mayer, A. M. (2006): Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* 67: 2318-2331.
- McKenzie, E. H. C., Pinnoi, A., Wong, M. K. M., Hyde, K. D., Jones, E. B. G. (2002): Two new hyaline *Chalara* species, and a key to species described since 1975. *Fungal Diversity*, 11, 129-139.
- McKinney, L.V., Nielsen, L.R., Hansen, J.K., Kjaer, E.D. (2011): Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. *Heredity* 106, 788–797.
- McKinney, L.V., Thomsen, I.M., Kjar, E.D., Nielsen, L.R. (2012a): Genetic resistance to *Hymenoscyphus pseudoalbidus* limits fungal growth and symptom occurrence in *Fraxinus excelsior*. *For. Pathol.* 42, 69–74.
- McKinney, L.V., Thomsen, I.M., Kjar, E.D., Bengtsson, S.B.K., Nielsen, L.R., (2012b). Rapid invasion by an aggressive pathogenic fungus (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) replaces a native decomposer (*Hymenoscyphus albidus*): a case of local cryptic extinction? *Fung. Ecol.* 5, 663-669
- Metzler, B. (2009): Waldschutzinfo 4/2009: Eschentriebsterben - *Chalara fraxinea* in Südwestdeutschland. FVA Baden-Württemberg, Abteilung Waldschutz.
- Metzler, B. (2010): Waldschutzinfo 3/2010: Weitere Entwicklung des Eschentriebsterben. FVA Baden-Württemberg, Abteilung Waldschutz.
- Metzler, B. (2010): Waldschutzinfo 3/2010: Weitere Entwicklung des Eschentriebsterben. FVA Baden-Württemberg, Abteilung Waldschutz.
- Metzler B. (2012): Eschentriebsterben: Schadensintensivierung durch Stammfußnekrosen. Waldschutz-INFO 3/2012
- Metzler B; Enderle R; Karopka M; Töpfner K; Aldinger E. (2012): Entwicklung des Eschentriebsterbens in einem Herkunftsversuch an verschiedenen Standorten in Süddeutschland. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung* (im Druck).
- Möbius, N. & Hertweck, C., (2009): Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 390-398.
- Moffatt, J. S., Bu'Lock, J. D., Yuen, T. H. (1969): Viridiol, a steroid-like product from *Trichoderma viride*. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, (14), 839a-839a.
- Moon, C.D., Craven, K.D., Leuchtmann, A., Clement, S.L. & Schardl, C.L. (2004): Prevalence of interspecific hybrids amongst asexual fungal endophytes of grasses. *Molecular Ecology* 13, 1455-1467.
- Mounce, I. (1929): Studies in forest pathology: II. The biology of *Fomespinicola* (SW.) Cook. Canada, Departement of Agriculture: Bulletin No. III New Species: 75.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473–479.
- Nakatsubo, F. (2001): Chemical synthesis of Cellulose. *Wood and cellulosic chemistry*, Ausgabe 2.
- Ng, T. K. & Zeikus J. G. (1980): A continuous spectrophotometric assay for the determination of cellulase solubilizing activity. *Analytical Biochemistry* 103: 42-50.

- Niere, B.I.; Sikora, R.A.; Speijer, P.R.; Nirenberg, H.I., (2000): *Fusarium oxysporum* zur biologischen Bekämpfung von Nematoden: Überprüfung der Apathogenität der verwendeten Isolate mit vegetativer Kompatibilität (VCG). Abstract der Tagung: Arbeitskreis Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten, in Aschersleben.
- Niinemets, Ü., Kull, O., & Tenhunen, J. D. (1998): An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree physiology*, 18(10), 681-696.
- Nobles, M. K. (1965): Identification of cultures of wood-inhabiting *Hymenomyces*. *Canadian Journal of Botany* 43: 1097-1139.
- Ogris, N., Hauptman, T., Jurc, D. (2009): *Chalara fraxinea* causing common ash dieback newly reported in Slovenia. *New Disease Reports*.
<http://www.bspp.org.uk/publications/new-diseasereports/>, Vol. 19, Feb. 2009 to Aug. 2009.
- Ogris, N.; Hauptman, T.; Jurc, D.; Floreancig, V.; Marsich, F.; Montecchio, L. (2010): First report of *Chalara fraxinea* on common ash in Italy. *Plant Disease* 94(1): 133.
- Osman-Ghani, N. (1982): The uses and limitations of detached leafculture for the assessment of reaction type in yellow rust of barley. *Cereal Rusts Bull.* 10: 16-21.
- PATHCAR, (2007): Ash decline in Baltic and Nordic countries. www.metla.fi/org/pathcar/ash-decline.htm
- Pautasso, M., Aas, G., Queloz, V., Holdenrieder, O. (2013): European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback - a conservation biology challenge. *Biological Conservation*, Bd.:158, S.: 37 - 49 Doi-Nummer: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2012.08.026>
- Peters, S., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B. (1998): Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia* 90, 360-367.
- Pfister, D.N. (1993): A synopsis of the North American species of *Byssonectria* (Pezizales) with comments on the ontogeny of two species. *Mycologia* 85, 952-962.
- Phillips, W. (1893): A manual of the British Discomycetes, 2nd edn. London: Kegan Paul, Trench, Trübner & Co, Ltd.
- Pointing, S.B. (2000): Lignocellulolytic enzyme assays. *Marine Mycology – A Practical Approach*, (Hyde KD & Pointing SB, eds), Fungal Diversity Series 1, Fungal Diversity Press, Hong Kong: 137 – 157.
- Pointing, S.B.; Pelling, A.L.; Smith, G.J.D.; Hyde, K.D., (2005): Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycol. Research* 109 (1): 115-124.
- Potthast, K. & Hamm, R. (1973): Ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Ermittlung lipolytischer Veränderungen im Fleisch. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 153: 6-12.
- Proplanta, (2010): http://www.proplanta.de/Agrar-Nachrichten/Wissenschaft/Neuer-Pilz-geht-Eschen-ans-Mark_article1270983586.html.
- Prieditis, N. (1999): *Picea abies*- and *Fraxinus excelsior*-dominated wetland forest communities in Latvia. *Plant Ecology*, 144(1), 49-70.

- Przybył, K. (2002): Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. For. Path. 32, 387-394.
- Queloz, V.; Grünig, C.R.; Berndt, R.; Kowalski, T.; Sieber, T.N.; Holdenrieder, O. (2011): Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. Forest Pathology 41, (2): 133–142.
- Raquin, C.; Jung-Muller, B., Dufour, J. & Frascaria-Lacoste, N. (2002): Rapid seedlings obtaining from European ash species *Fraxinus excelsior* (L.) and *Fraxinus angustifolia* (Vahl.). Annals of Forest Science 59: 219-224.
- Redman, R.S.; Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J., (2001): Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? New Phytologist 151: 705-716.
- Rehm, H. (1896): Ascomyceten: Hysteriaceen und Discomyceten. In: Dr L. Rabenhort's Kryptogamen-Flora, 2nd edn. Band I, III Abteilung. Ed. by Fischer, A.; Hauck, F.; Limpricht, G.; Luerssen, C.; Migula, W.; Rehm, H.; Richter, P.; Winter, G. Leipzig: Verlag von Eduard Kummer. pp. 797-798.
- Rieder G (1981): Calcium cyanamide-fertilizer or pesticide? World Crops, January: 17–21.
- Robin, C. & Heiniger, U. (2001): Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, 76(3), 361-367.
- Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U., Stimm, B. (2010): Bäume Mitteleuropas: von Aspe bis Zirbel-Kiefer: mit den Porträts aller Bäume des Jahres von 1989 bis 2010. Wiley-VCH.
- Römmert, A.-K., Oros-Sichler, M., Lange, T., Aust, H.J. & Schulz, B. (2002): Growth promoting effects of endophytic colonisation of the roots of larch seedlings (*Larix decidua*) with *Cryptosporiopsis* sp. and *Phialophora* sp. Abstracts, 7th International Mycological Congress Oslo: 309.
- Rytkönen, A.; Lilja, A.; Drenkhan, R.; Gaitnieks, T.; Hantula, J. (2011): First record of *Chalara fraxinea* in Finland and genetic variation among isolates sampled from Åland, mainland Finland, Estonia and Latvia. For. Path. 41, 169-174
- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. & Sullivan, T.J. (1998): Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. Annual Review Ecol. Syst. 29: 319-343.
- Schafer, M. R. & Kohn L. M. (2006): An optimized method for mycelial compatibility testing in *Sclerotinia sclerotiaorum*. Mycologia 98: 503-597.
- Schardl, C.L. & Clay, K. (1997): Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. In: The mycota V part B plant relationships, Vol Eds: Carroll, G.C. & Tudzynski, P. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 221-238.
- Schulz, B. & Boyle, C. (2005): The endophytic continuum. Mycological Research 109: 661-686.
- Schulz, B. (2006): Mutualistic interactions with fungal root endophytes. IN: *Microbial Root Endophytes*, Springer Verlag, Berlin, pp. 261-279.
- Schulz, B., Römmert A.-K., Damman, U., Aust, H.-J., Strack, D. (1999): The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? Mycological Research 103, 1275-1283.

- Schulz, B.; Draeger, S.; dela Cruz, T.E.; Rheinheimer, J.; Siems, K.; Loesgen, S.; Bitzer, J.; Schloerke, O.; Zeeck, A.; Kock, I.; Hussein, H.; Dai, J.; Krohn, K. (2008): Screening strategies for obtaining novel, biologically active secondary metabolite from marine habitats. *Botanica Marina* 51: 219-234.
- Schulz, B.; Meier, K.; Krohn, K.; Draeger, S., (2011): Endophytic fungi - creative producers of secondary metabolites, and screening strategies for their isolation. In: Prospects and Applications for Plant-associated Microbes. A Laboratory Manual. Part B: Fungi. *BB(BioBien Innovations)*, Finland.
- Schumacher, J.; Wulf, A.; Leonhard, S. (2007): Erster Nachweis von *Chalara fraxinea* T. Kowalski sp. nov. in Deutschland – ein Verursacher neuartiger Schäden an Esche. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz* 59: 121-123.
- Schumacher, J.; Kehr, R.; Leonhard, S. (2009): Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *Forest Pathology* 40 (5): 419-429.
- Schumacher, J.; Kehr, R.; Leonard, S. (2010): Mycological and histological investigations of *Fraxinus excelsior* nursery saplings naturally infected by *Chalara fraxinea*. *For. Path.* 40, 419-429.
- Schumacher, J. (2011): The general situation regarding ash dieback in Germany and investigations concerning the invasion and distribution strategies of *Chalara fraxinea* in woody tissue. The Author. Journal compilation 2011 OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 41, 7–10.
- Sierra, G. (1957): A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg.* 23: 15-22.
- Skovsgaard, J.P.; Thomsen, I.M.; Skovsgaard, I.M.; Martinussen, T. (2010): Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *For. Path.* 40, 7-18.
- Sobczyk, T. (2009): Waldschutzzinformation Juli 2009 für den Landkreis Bautzen. www.landkreis-bautzen.de
- Solomon, E. I.; Baldwin M.J. & Lowery M.D. (1992): Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chem Rev* 92: 521-542.
- Stevens, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Szabo I (2009). First report of *Chalara fraxinea* affecting common ash in Hungary. *Plant Pathology* 58, 797.
- Tapper, P.G. (1996): Tree dynamics in a successional *Alnus-Fraxinus* woodland. *Ecography* 19:237–244.
- Thomsen, I. M.; Skovsgaard, J. P.; Barklund, P.; Vasaitis, R. (2007): Svampesygdom er årsag til toptørre i ask [A fungal disease is the cause of dieback of ash]. *Skoven* 5: 234–236.
- Thorn, G. R. (1993): The use of cellulose azure agar as a crude assay of both cellulolytic and ligninolytic abilities of wood-inhabiting fungi. *Proceedings of the Japan Academy* 69: 29-34.

- Timmermann, V., Borja, I., Hietala, A.M., Kirisits, T., Solheim, H. (2011): Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway. EPPO Bull. 41, 14–20.
- Venn, A. & Venn-Rosky, J. (2010): Das Farbwörterbuch: Die Farbigkeit der Begriffe. Callwey-Verlag, Auflage 1.
- Verkley, G.J.M. (1993): Ultrastructure of the ascus apical apparatus in *Hymenoscyphus* and other genera of the Hymenoscyphoideae (Leotiales, Ascomycotina). Persoonia 15, 303–340.
- Vincent, D., Tan, K. C., Cassidy, L., Solomon, P. S., Oliver, R. P. (2012): Proteomic Techniques for Plant–Fungal Interactions. Methods Mol Biol. 2012;835:75–96.
- Wallander, E. (2008): Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecy. Plant Syst. Evol. 273, 25–49.
- Wang, L., Hu, T., Ji, L. Cao, K. (2007): Inhibitory efficacy of calcium cyanamide on the pathogens of replant diseases in strawberry. Front. Agric. China 2007, 1(2): 183–187.
- Webber, J., Hendry, S. (2012): Rapid Assessment of the Need for a Detailed Pest Risk Analysis for *Chalara fraxinea*. Forest Research, UK, 15 pp.
- Wheeler, H. (1981): Role in Pathogenesis. In: Durbin RD (ed) Toxins in Plant Diseases, Ch 13, Academic Press: New York: 477–94.
- White W. L. (1944): Studies in the genus *Helotium*, IV - some miscellaneous species. Farlowia 1: 599–617.
- White, T. M.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Ed. by Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. New York: Academic. pp. 315–233.
- Wipf, P. & Kerekes, A. D. (2003): Structure reassignment of the fungal metabolite TAEMC161 as the phytotoxin viridiol. Journal of natural products, 66(5), 716–718.
- Wright, J. M. (1951): Phytotoxic effects of some antibiotics. Annals of Botany, 15 (4), 493–499.
- Yarwood, C. E. (1946): Detached leaf culture. The botanical review 12 (1): 1–56.
- Zhuang, W.Y. & Liu, D.Y. (2007): Taxonomic reassessment of two taxa of the Helotialean fungi. Mycotaxon 99, 123–131.
- Zhang, W. H. & Zhuang, W.Y. (2004): Phylogenetic relationships of some members of the genus *Hymenoscyphus* (Ascomycetes, Helotiales). Nova Hedwigia 78, 475–484.
- Zhao, Y.; Hosoya, T.; Baral, H.; Hosaka, K.; Kakishima, M. (2012): *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. Mycotaxon 122, pp. 25–41(17).
- Zellner, J. (1910): Zur Chemie der höheren Pilze. VI. Mitteilung: Chemische Beziehungen zwischen höheren parasitischen Pilzen und ihrem Substrat. Monatshefte für Chemie, Nr. 6.
- Zheng Wang et al.: Toward a phylogenetic classification of the Leotiomycetes based on rDNA data. In: Mycologia. Band 98, 2006, S. 1065–1075.

7. Waldschutz-Info (2009): Eschentriebsterben III - Vorläufige Handlungsempfehlungen. Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung Waldschutz.

Bayer CropScience Australia: Prosper® 500 EC Fungicide. Available at: <http://www.bayercropscience.com.au/cs/products/productdetails.asp?id=220>

http://www.euforgen.org/distribution_maps.html

<http://www.forestry.gov.uk/chalara>

Makhteshim Agan Industries Ltd., 2003: Mirage. Available at: <http://www.makhteshim.com/Data/Catalog/bio/mirage.pdf>

http://www.teagasc.ie/forestry/advice/chalara_disease.asp

9. Anhang

Tabelle 9.1: Charakterisierung aller sich in der Stammsammlung befindlichen Isolate von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Die Kultivierung erfolgte auf KM-Agar und Biomalz-Agar bei 20 °C.

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 398	cremeweiß, elfenbeinfarbige Verfärbung am Rand (nur auf einer Seite der Wachstumszone)	hellelfenbein, elfenbein, perlweiß ungleichmäßig gemischt	dicht, pudrig	kompakt, rund
C 399	cremeweiß	elfenbein, melonengelb	rund	herzförmig
C 400	verkehrsweiß	elfenbein, safrangelb mit melonengelben Flecken	flach, dünn, pudrig	uneben, dicht
C 401	verkehrsweiß	maisgelb, hellelfenbein und rapsgelb Innen, Außen reinweiß	etwas uneben, dünn, pudrig	uneben, zentral hügelig, zum Rand dünn
C 402	reinweiß	reinweiß in der Wachstumszone, elfenbein	gleichmäßig rund kompakt	kompakt, zonenartig, vermutlich Aufspaltungen, pudrig/flauschig aber flach
C 403	reinweiß	grauweiß mit leichtem grünschimmer, gelbbraune Verfärbung der Mitte	fusselig, ungl., Aufspaltung	eben, flaumig
C 404	reinweiß	hellelfenbein, gelbbraune und melonengelbe Flecken	kompakt, gleichmäßig, rosettenartig, geriffelter Saum	rund, kompakt
C 405	reinweiß, graue Flecken	elfenbein, safrangelbe und reinweiße Flecken	rund, gleichmäßig	blumige form, Aufspaltungen
C 406	cremeweiß	2/3 reinweiß mit safrangelb u. ockerbraune Tupfen, 1/3 ockerbraun (Sektor)	ungleichmäßig, pudrig	2/3 huckelig, ungl., wattig, 1/3 uneben, fusselig, fransiger Rand
C 407	reinweiß	Rand signalweiß, safran- u. pastellgelb tupfig	dünn, pudrig	Rand flach, ungl., fusselig, eben
C 408	verkehrsweiß	Innen melonengelb und ockergelb, Außen rein- bis cremeweiß	dünn, samtig	ungleichmäßig, pudrig
C 409	reinweiß	verkehrsweiß, zentral leicht beige	dünn, eben	eben, wattig
C 410	perlweiß, hellelfenbein	safrangelb/zinkgelb gelbbraune Flecken	rund, kompakt	ungleichmäßig, kompakt
C 411	reinweiß	cremeweiß, elfenbein mit gelbbraunen currygelben, pastellgelben Flecken	ausgefranst, pudrig, ungl.	kompakt, pudrig, ungl.
C 412	perlweiß, hellelfenbein	reinweiß in der Wachstumszone, safrangelb in der Mitte danach elfenbein	sehr ungleichmäßig, Aufspaltungen	fast rund, gleichmäßig
C 413	reinweiß, hellelfenbein	elfenbein, ginstergelb, pastellgelb	rund, kompakt	rund, kompakt

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 414	reinweiß	elfenbein, safrangelb+ melonengelb (ringförmig)	rund, kompakt, gleichmäßig	rund, kompakt, gleichmäßig
C 415	reinweiß	reinweiß, elfenbein	pudrig, dicht, flach	eben, dicht
C 416	reinweiß	reinweiß in der Wachstumszone, gelbbraun safrangelb in der Mitte	rund, kompakt, gleichmäßig	rund, kompakt, gleichmäßig
C 417	reinweiß	seidenmatt weiß, reinweiß	rund, kompakt, gleichmäßig	rund, kompakt, puderartig
C 418	reinweiß mit rapsgelben Verfärbungen im Zentralbereich	seidenmatt weiß, Aufspaltung hellelfenbein	flach, weitgehend rund, kompakt	dichter, rund mit Aufspaltung, tortenstückförmig
C 419	reinweiß, hellelfenbein	elfenbein, verkehrsweiß in der Mitte	rund, kompakt, gleichmäßig	rund, kompakt, gleichmäßig
C 420	reinweiß	cremeweiß mit melonengelben+ ockergelben Verfärbungen	kompakt, rund, leicht strahlenförmig	ungleichmäßig
C 421	reinweiß mit safrangelben Verfärbungen der Mitte	elfenbein in der Wachstumszone, currygelb in der Mitte	flaumig, flach	pudrig, kompakt
C 422	zentral rapsgelb, außen verkehrsweiß	fleckig safrangelb, orangebraun, reinweiß, grauweiß	ungleichmäßig, dicht, pudrig	ungleichmäßig, kompakt, porig
C 423	reinweiß mit hellelfenbein	hellelfenbein, elfenbein, gelbbraun, currygelb in Ringen	rund, kompakt, mit Aufspaltung	relativ rund, leicht blumige Form, mit Aufspaltung, samtig
C 424	reinweiß	cremeweiß, orangebraune Flecken (mittig)	rosettenartig, fest	relativ gleichmäßig, samtartig
C 425	reinweiß	reinweiß	rund, kompakt, gleichmäßig	rund kompakt mit Aufspaltung, leicht puderartig
C 426	reinweiß	safrangelb, Wachstumszone hellelfenbein	rund	fast rund, samtig
C 427	reinweiß	1/3 orangebraun, safrangelb u. melonengelb, 2/3 reinweiß mit orangebraunen Flecken	glatt, dünn	Sektorbildung, 1/3 ringartig gleichmäßig, rund, samtig, 2/3 ungleichmäßig u. huckelig
C 428	reinweiß	hellelfenbein, gelbbraun, honiggelb	Segmentbildung, ungleichmäßig, ringartig	ungl., uneben, fusselig
C 429	verkehrsweiß	hellelfenbein, seidenmatt weiß mit elfenbeinfarbenen Flecken	flaumig, strahlenförmig	dünn, pudrig, ungleichmäßig
C 430	cremeweiß	Rand signalweiß, orangebraun	dünn, pudrig	pudrig, fransiger Rand, flach, ungleichmäßig
C 431	verkehrsweiß, hellelfenbein, safrangelbe Flecken	elfenbein, braunbeige, safrangelb in Ringen	starke Aufspaltung	ringartig, rund, schwache Aufspaltung
C 432	reinweiß	Reinweiß mit dahliengelben und pastellgelben Verfärbungen	gleichmäßig rund	gleichmäßig rund

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 433	verkehrsweiß	Wachstumszone verkehrsweiß, safrangelb+ ockergelb im Innenbereich nicht gleichmäßig	ungleichmäßig, mit Aufspaltung	ungleichmäßig, mit Aufspaltung , melonengelbe winzige Tröpfchen
C 434	reinweiß	orangebraun, safrangelb, elfenbein	Aufspaltung, samtig, ungleichmäßig	kompakt, flach, samtartig, ungleichmäßig
C 435	reinweiß	reinweiß, mitmelonengelb, gelbbraun, nach außen hin zinkgelbe Flecken	rund kompakt mit Aufspaltung	gleichmäßig rund
C 436	reinweiß	elfenbein	flach, gleichmäßig rund	flach, gleichmäßig rund, samtig
C 437	verkehrsweiß	reinweißes Myzel mit safrangelben Ring mittig	sehr dünn, leicht pudrig	dicht, wattig
C 438	reinweiß	reinweiß, in der Mitte orangebraun, seidenmatt weiß	samtig, dünn, flach	kompakt, rund, samtartig
C 439	reinweiß	mehrere gleichmäßige Ringe in pastellgelb, hellelfenbein und cremeweiß	fach, dünn	dicht, eben, rund
C 441	reinweiß	elfenbein, safrangelb mit melonengelben Flecken	samtig, dünn, flach	rund mit Aufspaltung
C 442	cremeweiß, mit gelbbraunen bis safrangelben Flecken	elfenbein, mit gelbbraunen/safrangelb en Flecken	dünn, pudrig, ungleichmäßig	dünn, fusselig, ungleichmäßig
C 443	verkehrsweiß	elfenbein, safrangelb mit melonengelben Flecken	flach, dünn, pudrig	uneben, dicht
C 444	reinweiß, leichte Verfärbung zu elfenbein in der Mitte	elfenbein mit gelbbraunen Flecken	Zonen, samtig, teilweise dünn	Zonen, ungleichmäßig, eben, fusselig
C 445	cremeweiß, Verfärbung der Mitte zu hellelfenbein	hellelfenbein, safran, gelbbraun in Ringen	relativ rund mit einer Ausbeulung	rund, kompakt, samtig
C 447	cremeweiß	elfenbein, gelbbraun	rund, kompakt, gleichmäßig	rund, kompakt, gleichmäßig
C 448	cremeweiß	zentral curry- und ginstergelb, verkehrsweißer Rand	pudrig, ungleichmäßig	dicht, flach, ungleichmäßig
C 449	reinweiß	seidenmatt weiß, sonnengelbe Verfärbung in der Mitte	rund	rund, samtig
C 450	reinweiß	elfenbein mit honiggelber Verfärbung der Mitte	rund, flach	strahlenförmig, flach, rund
C 451	signalweiß	fleckig, pastellgelb, orangebraun, Rand verkehrsweiß	pudrig, ungleichmäßig	dicht, welliger Rand, huckelig
C 452	reinweiß	seidenmatt weiß, hellelfenbeinfarbene Aufspaltungen	relativ rund, gleichmäßig	ungleichmäßig, Segmentbildung , ringartig, pudrig
C 453	creme- bis perlweiß	zentral kupferbraun, Rand hellelfenbein bis safrangelb	ungleichmäßig, dicht	kompakt, ungleichmäßig, krisselig
C 454	hellelfenbein	seidenmatt, safrangelb, ginstergelbe Schattierungen, ungleichmäßig	dünn, samtig, strahlenförmig	dicht, zentral huckelig, fusselig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 455	reinweiß mt safrangelber Verfärbung	hellelfenbein mit seidenmatt weißen Verfärbungen	rund	Verfärbungen puderartig, gleichmäßig
C 456	reinweiß	verkehrsweiß, safrangelbe Verfärbungen	ungleichmäßig, oval	rund, flaumig
C 457	reinweiß	reinweiß, hellelfenbein, mit ockergelben Verfärbungen	ungleichmäßig, blumenartig	relativ rund, gleichmäßig
C 458	perlweiß	hellelfenbein, safrangelbe Flecken	gleichmäßig, pudrig	körnig, fransig, dicht
C 459	reinweiß	Sektor cremeweiß, melonengelb, pastellgelb, reinweiße Punkte	pudrig, uneben	Sektor, ungleichmäßig, huckelig, zum Rand dünner
C 460	reinweiß	elfenbein, ockergelb	Segmentbildung ungleichmäßig, ringartig	Segmentbildung ungleichmäßig, ringartig, ausgefranst
C 461	reinweiß	eine Seite hellelfenbein, andere hellelfenbeinfarbige Wachstumszone, safrangelber gelbbrauner Ring	dünn, pudrig	Aufspaltung, eine Seite leicht flauschig/rund andere ausgefranst, fest
C 462	reinweiß	reinweiß mit elfenbein und ockergelber Verfärbung der Mitte	dünn, pudrig	rund, gleichmäßig
C 463	reinweiß mit safrangelber Verfärbung der Mitte	elfenbein, safrangelb, ockergelb mit unregelmäßigen Flecken	unregelmäßig, Aufspaltungen, flach, samtig	relativ rund, kompakt, gleichmäßig
C 464	reinweiß	reinweiß, Aufspaltung elfenbein	dicht, fusselig	relativ rund mit Aufspaltung, fest
C 465	reinweiß	seidenmatt weiß, hellelfenbein, elfenbein, safrangelb, ungleichmäßig verfärbt mit currygelben Flecken	relativ rund, gleichmäßig, eine Ausbuchtung	unregelmäßig, Aufspaltung in zwei Hälften, teilweise flaumig
C 466	signalweiß	zentral ockerbraun mit cremeweißen Noppen, Ring außen reinweiß	pudrig, eben	rund, gleichmäßig, körnig
C 467	reinweiß	hellelfenbein mit Verfärbungen in safrangelb	rund, flach, gleichmäßig	rund, flach, gleichmäßig
C 468	reinweiß	gelbbraun, dahliengelbe Ringe	pudrig, dünn, strahlenförmig, fest	samtig, ringartig
C 469	reinweiß	hellelfenbein, gelbbraun, safrangelb gemustert	Segmentbildung ungleichmäßig, strahlenförmig	rund, kompakt
C 470	reinweiß	verkehrsweiß, elfenbeinfarbene Verfärbung der Mitte	rund, flach, gleichmäßig	rund, samtig, gleichmäßig
C 471	reinweiß	hellelfenbein, reinweiß	rund, kompakt	rund, kompakt
C 472	cremeweiß	seidenmatt weiß, ginstergelb, ockerbraun unregelmäßige Verfärbung	flach, dünn, pudrig	unregelmäßig, uneben, teilweise flaumig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 473	verkehrsweiß	melonengelb, grauweiß, pastellgelb	wattig, dicht	Sektoren, huckelig, fleckig
C 474	reinweiß mit rapsgelben Verfärbungen	elfenbein, ginstergelb	pudrig, dicht	relativ rund, kompakt, körnig
C 475	cremeweiß	elfenbein, ockergelb, safrangelb, ungleichmäßig	pudrig, dicht	ungleichmäßig, Rand wolkig,
C 476	cremeweiß	perlweiß, elfenbein mit gelbbraunen Tröpfchen	pudrig, dicht, Aufspaltung	rund, leicht pudrig/flauschig, nicht flach
C 477	signalweiß	zentral ockerbraun, zum Rand cremeweiß bis hellelfenbein	dünn, samtig	flach, schwach Sektorbildung, franst dünn aus
C 478	reinweiß mit winzigen zinkgelben Verfärbungen an den Rändern	elfenbein, safrangelbe+ gelbbraune Verfärbungen	ungleichmäßig, Ausbuchtungen	ungleichmäßig, ausgefranst
C479	reinweiß mit zitronengelb	Sektoren pastellgelb u. ockerbraun, hellelfenbein bis safrangelb	dicht, samtig	blumige krisselige Sektoren, flaumig
C 480	cremeweiß	cremeweiß, elfenbein, safrangelb, gelbbraun ringartig	dünn, pudrig, eben	eben, ungleichmäßig, Zone, pudrig
C 481	verkehrsweiß	verkehrsweiß, safrangelbe Verfärbungen	Kolonierand ungleichmäßig, kompakt	Kolonierand ungleichmäßig, kompakt
C 482	signalweiß	safrangelb, hellelfenbein, vereinzelt ockerbraune Flecken	dicht, pudrig	gleichm. rund, ringartig, dicht, leicht flaumig
C 483	cremeweiß	zentral honiggelb, außen beige	pudrig, uneben	flach, dünn samtig, gleichm.
C 484	reinweiß, seidenmatt, teilweise weiß	perlweiß, elfenbein, safrangelb mit melonengelben Flecken (von innen nach außen)Wachstumszone seidenmatt weiß	rund, Ringe, uneben	rund, Ringformen, pudrig, nicht flach
C485	signalweiß	Sektor ockerbraun, cremeweiß mit orangebraunen Flecken, außen ockerbrauner Ring	gleichmäßig, pudrig, eben	ungleichmäßig, Sektor zu einer Seite krisselig und fransig, uneben, ringartig
C 486	reinweiß mit zitronengelb	zentral maisgelbe Tupfen, sonst hellelfenbein	dicht, samtig	gleichmäßiges Wachstum, leichte Einbuchtungen, tüpfelig, wattig
C 487	reinweiß	hellelfenbein Wachstumszone, ockergelb bis honiggelbe Mitte	relativ rund, gleichmäßig	relativ rund, randverlauf unregelmäßig
C 488	signalweiß	zentral und im äußeren Ring pastellgelb, Zentrum sonnengelber ungleichmäßiger Ring, sonst reinweiß	pudrig, uneben	Ränder ungleichmäßig, kompakt, fusselig
C 489	reinweiß, cremeweiß, sternförmig verfärbte Mitte	safrangelb, melonengelb verfärbte Mitte	samtig, strahlen- und sternenförmig	ungleichmäßig, blumenförmiger Rand, Aufspaltung, samtig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 490	cremeweiß mit signalgelb	zentral orangebraun mit Ausläufern zu safrangelb und pastellgelb, außen seidenmatt	uneben, samtig	ungleichmäßig. Wachstum in eine Richtung., welliger Rand, flaumig
C 491	verkehrsweiß	reinweiß, orangebraun, perlkupfer, melonengelbe Tupfen	sehr dünn, leicht pudrig	fleckig, hügelig, dicht gewachsen, netzartige Oberfläche
C 492	reinweiß	hellelfenbein, safrangelbe Flecken	sehr dünn, flach	ungleichmäßig, pudrig, Zonen
C 493	grauweiß	zentral safrangelb mit sonnengelben Flecken, vereinzelt cremeweiße Stellen	flach, dünn, samtig	Einkerbungen am Rand, dicht kompakt, pudrig
C 494	cremeweiß	reinweiß, safrangelb breite Zone am Rand	kompakt, pudrig	pudrig, z.T. dünn wachsend in eine Richtung., ungleichmäßig, fransig
C 495	reinweiß	elfenbein, safrangelb in der Mitte	rund, kompakt	fast rund mit Aufspaltung
C 496	cremeweiß	zentral rapsgelb, äußerer Rand cremeweiß	kompakt, pudrig	gleichmäßig, rund, relativ flach, zentral nuppelig
C 497	reinweiß	hellelfenbein, elfenbein, mit safrangelbe+ gelbbraune Verfärbungen	rund, glatt, gleichmäßig	rund, flaumig, gleichmäßig
C 498	reinweiß	seidenmatt weiß	rund, kompakt	rund, puderartig
C 499	verkehrsweiß	grauweiß, dünneres Myzel grau-aluminium	sehr dünn, leicht pudrig	samtig, flauschig, ungleichmäßig, zu einer Seite Myzeländerung
C 500	zentral rapsgelbe Tupfen, sonst verkehrsweiß	cremeweiß mit perlkupfer und safrangelben Flecken	kompakt, uneben	ungleichmäßig, Sektorbildung mit flachen pudrigem Myzel, fleckige Struktur
C 501	verkehrsweiß	cremeweiß, Zentralbereich leichte Verfärbung hellelfenbein	kompakt, fast rund	nicht gleichmäßig, mit Ausbuchtung, teilweise nur in eine Richtung
C 502	reinweiß	seidenmatt weiß	glatt, sehr dünn	ungleichmäßig, puderartig, stellenweise flaumig
C 503	cremeweiß	seidenmatt weiß mit zinkgelben Verfärbungen	gleichmäßig, rund, flach	ungleichmäßig, mit Aufspaltung, flaumig
C 504	verkehrsweiß	safrangelb, ockerbraun	flach, dicht, pudrig	ringartig mit zwei dreiecksartigen Einschnitten(dünn grauweiß), flach
C505	innen cremeweiß, außen verkehrsweiß	hellelfenbein, Rand reinweiß, graphitschwarze Spitzen zu einer Seite	sehr kompakt, uneben	dicht, samtig, fransig
C 506	innen rapsgelb, außen reinweiß	zentral ginstergelb, außen reinweiß	dünn, pudrig	strahlenförmig mit Einkerbungen, pudrig
C 507	reinweiß	ockergelb bis reinweiß	dünn, pudrig	flach, cashmere, strahlenförmig
C 508	verkehrsweiß	reinweiß, Rand dunkel durchscheinend	sehr dünn, leicht fusselig	am Impfstück sehr kompakt mit starken Riefen am Rand, zu zwei Seiten halbmondförmiges dünnes Myzel, leicht wattig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 509	reinweiß	cremeweiß/signalweiß, currygelbe, ginstergelbe Verfärbung der Mitte mit vereinzelt kleinen Flecken	pudrig, ungleichmäßig, Segmentbildung, flach	ungleichmäßig, welliger Rand, kompakt, samtig pudrig
C 510	reinweiß	reinweiß, seidenmatt weiß mit Verfärbung der Mitte zu elfenbein	flach, relativ gleichmäßig	ungleichmäßig gewachsen, flaumig, stellenweise flauschig
C 511	cremeweiß	gefleckt reinweiß, pastellgelb, zinkgelb, Rand teilweise perlakupfer, äußeres Myzel verkehrsweiß	ungleichmäßig, pudrig	ungleichmäßig, wattig, huckelig,
C 512	cremeweiß	elfenbein mit rapsgelben Flecken	rund	relativ rund, gleichmäßig
C 513	verkehrsweiß mit signalgelben Stellen	pastellgelb, melonengelb, Rand verkehrsweiß	uneben, dicht	ungleichmäßig, zwei starke Einkerbungen, fusselig
C 514	cremeweiß	sonnengelb, pastellgelb, reinweiße Körnung, sonnengelber Ring, reinweißer Rand	dünn, pudrig	körnig, rundlich, ungleichmäßig, flaumig, dicht, fleckig,
C 515	reinweiß	zentral pastellgelb, reinweiß	kompakt, gleichmäßig	dicht, flauschig, Sektor flach u. dünn
C516	verkehrsweiß	Sektor ginstergelb bis reinweiß, orangebraun fleckig bis reinweiß	dünn, pudrig	ungleichmäßig, Sektor flach, Furche zu andersartigem Myzel, krisselig, uneben, fusselig, fleckig
C517	reinweiß mit safrangelben Flecken	Sektoren reinweiß, pastellgelb bis orangebraun	uneben, dicht	Sektoren dünn, pudrig, ungl., dicht, wellenartig, uneben
C518	reinweiß	Sektoren reinweiß bis melonengelb, fleckig orangebraun, pastellgelb	ungleichmäßig, fusselig	strahlenförmig, uneben, Sektoren hügelig u. dünn, dicht, fleckig
C 519	reinweiß mit safrangelben Flecken	zentral reinweiß mit Ring kupferbraun, Rand reinweiß	ungleichmäßig, fusselig	dicht, krisselig, fransig, ungleichmäßig
C520	cremeweiß bis hellelfenbein	orangebraun u. reinweiß	dünn, eben	kompakt, flaumig, uneben, Sektoren, fleckig
C521	verkehrsweiß	gelbbraun, Rand reinweiß	dünn, eben, samtig	ungl., fransig, fusselig
C522	verkehrsweiß	Sektoren gelbbraun u. rehbraun bzw. elfenbein, reinweiß u. orangebraune Flecken	uneben, pudrig	Sektoren flach bzw. flauschig, blumiger Rand, unterbrochene Ringstruktur
C523	reinweiß	sonnengelb, pastellgelb, orangebraun, Spitzen weiß	ungleichmäßig, dicht	Sektoren, fleckig, flach, ausgefrantzt, noppig
C 524	verkehrsweiß	safrangelb, orangebraun, verkehrsweiß	strahlenförmig, dicht	fransig, dicht, noppig am Rand
C 525	creme- und reinweiß	ockerbraun, cremeweiß, elfenbein	uneben, dicht	ungleichmäßig, krisselig, dicht, fleckig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C526	creme- und reinweiß	zentral orangebraun u. blassbraun, reinweiß	uneben, dicht	zentral sternförmiges Myzel mit Ringmuster u. erhöhtem Rand, dahinter flach
C 527	verkehrsweiß	Sektoren reinweiß, orangebraun bis safrangelb	dünn, pudrig, eben	Sektoren flach, fleckig, uneben
C 528	cremeweiß	hellelfenbein, Rand safrangelb	dicht, pudrig	kompakt, ungleichmäßig, Einkerbungen, wolkig
C 529	cremeweiß	safrangelb, pastellgelb, orangebraune Flecken, äußerer Rand hellelfenbein	dünn, ungleichmäßig	Sektoren, flach, samtig, ungleichmäßig, symmetrisch
C 530	cremeweiß	zentral ockerbraun, Rand pastellgelb gefleckt	kompakt	ungleichmäßig, Einkerbungen, dicht flach, flaumig, Rand fleckig
C 531	verkehrsweiß	hellelfenbein	sehr dünn, eben	gleichmäßig., rund, innen dichter, wattig, fusselig
C 532	cremeweiß mit signalgelb	Sektoren grauweiß, cremeweiß u. ginstergelb, orangebraun u. pastellgelb	kompakt, strahlenförmig	Sektoren, ungleichmäßig, uneben, fusselig
C 533	verkehrsweiß mit rapsgelb	orangebraune Punkte, hellelfenbein	dicht, pudrig	blumiger Rand, körnig, krisselig
C 534	cremeweiß mit hellelfenbein	pastellgelb, safrangelb, melonengelb, cremeweiße Sprengel	samtig, dünn, ungleichmäßig	flach, ungleichmäßig, leicht ringförmig., samtig, huckelig
C 535	cremeweiß mit zinkgelb	Sektoren mahagonibraun und reinweiß, gelbbraun mit orangebraunen Flecken	dicht, ungleichmäßig	ungleichmäßig. Sektoren, uneben
C 536	verkehrsweiß	safrangelb, hellelfenbein	dünn, pudrig, eben	ringartig, ungl., pudrig
C 537	n.a.	safrangelb, Rand reinweiß	n.a.	ungleichmäßig, noppig, flaumig
C 538	cremeweiß	orangebraun, beigebraun, Rand reinweiß	dicht, pudrig	kompakt, ringartig, unreg.
C539	signalweiß	safrangelb	dicht, fusselig	kompakt, dicht, pudrig, ungleichmäßig mit Einkerbungen
C 540	reinweiß	zentral orangebraune Flecken, reinweiß, Sektor pastellgelb mit orangebraun	dünn, pudrig, eben	gleichmäßig., flach, wattig
C 541	cremeweiß	flächiges pastellgelb mit sonnengelben Flecken am Rand	dünn, fusselig	ungleichmäßig, uneben, fusselig
C542	eine Hälfte signalweiß, zweite Hälfte signalweiß mit pastellgelb durchscheinend	reinweiß	dicht, pudrig	dünn, pudrig, flach, zentral hügelig
C543	verkehrsweiß	gelbbraun bis grauweiß	dicht, ungleichmäßig	ungleichmäßig, fransig, dünn, uneben
C544	verkehrsweiß mit zinkgelb	Sektoren reinweiß, pastellgelb, Rand sonnengelb gefleckt, 2. Myzel elfenbein mit grau-aluminium u. ockerbraun	dicht, ungleichmäßig	Sektoren dünn, flauschig, ringförmig, ungleichmäßig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
C 545	reinweiß und schwach safrangelb	orangebraun, Rand reinweiß	dicht, pudrig	pudrig, rund, fransig, Sektor dünner, eben
C546	verkehrsweiß	reinweiß	dünn, fusselig	hügelig, krisselig, zum Rand dünn u. flächig
C 547	verkehrsweiß	Sektoren reinweiß, pastellgelb bis hellelfenbein	dünn, pudrig, eben	wellenartig, Sektoren dünn, ungleichmäßig
C548	verkehrsweiß	pastellgelb, cremeweiß	dicht, pudrig	ungleichmäßig, Einkerbungen, körnig, flaumig
Es 89a	verkehrsweiß	scheckig pastellgelb u. hellelfenbein	sehr dünn, pudrig	porig, eben, glatt, samtig, pudrig, gleichmäßig
Es 60c	verkehrsweiß	hellelfenbein, safrangelbe signalweiße u. ockerbraune Tupfen/Buckel	sehr dünn, pudrig	dünn, vereinzelt Buckel, gleichmäßig rund, Ringstruktur, fusselig
Es 20d	cremeweiß	pastellgelb, Rand mit pustelligen melonengelben u cremeweißen Huckeln	dünn, pudrig, ungleichmäßig	zentral flach, pudrig, Rand pustellig, gleichmäßig
EI 100	cremeweiß	pastellgelb, safrangelb, reinweiß, cremeweiß	fusselig, ungleichmäßig	ungleichmäßig, scheckig, uneben, wattig
EI 101	verkehrsweiß	grau, teerschwärze Linie außen, reinweiße Hügel, safrangelbe Flecken	dünn, pudrig	Einsenkungen, kompakt, ungleichmäßig, samtig
EI 102	reinweiß	reinweiß, graualuminium, safrangelbe Spritzer, teerschwärzer Rand	dicht, pudrig	Einsenkungen, kompakt, ungleichmäßig, samtig
EI 103	1/3 verkehrsweiß, 2/3 currygelb	zentral safrangelb, hellelfenbein, grau, graphitschwarz, teerschwärze Linie außen	dicht, pudrig	ungleichmäßig., pudrig, kompakt, flach
EI 104	reinweiß mit einem Fleck grünbraun	innen grau, verkehrsweißer Sektor, safrangelb, verkehrsweißer Rand	dicht, pudrig	uneben, wattig, ungleichmäßig, fransig
EI 105	reinweiß	zentral gelbbraun, außen graualuminium bis dunkelgrau, teerschwärze Linie außen	dünn, pudrig	kompakt, ungleichmäßig, Furchen, pudrig
EI 106	reinweiß	1/3 pastellgelb, 2/3 grau, papyrusweiß mit reinweißen Hügeln	dicht, uneben	1/3 eben, leicht krisselig, 2/3 hügelig, fusselig, ungleichmäßig, fransig
EI 107	reinweiß mit rapsgelben Flecken	cremeweiß, melonen-, safrangelb u. ockerbraun, teilw. dunkelgrau	dicht, ungleichmäßig	uneben, Absenkungen, dünne u. kompakte Stellen, samtig u. krisselig
EI 108	verkehrsweiß mit safrangelben Fleck	1/2 safrangelb u. hellelfenbein, 1/2 grau, dunkelgrau u. cremeweiß, teerschwärze Linie außen	dünn, pudrig, ungleichmäßig	1/2 eben, wattig, 1/2 eben, fusselig, ungleichmäßig
EI 109	reinweiß	1/2 safrangelb u. hellelfenbein, 1/2 grau, dunkelgrau u. cremeweiß, teerschwärze Linie außen	dünn, ungleichmäßig	1/2 eben, krisselig, gleichmäßig, 1/2 uneben, hügelig, fusselig, ungleichmäßig

Stamm	Farbe des Myzel		Beschaffenheit Myzel	
	KM	BM	KM	BM
El 110	verkehrsweiß	grau, teilweise teerschwärze Linie außen, innen reinweiße u. elfenbeinfarbene Stellen, orangebraune Flecken und Linien	sehr dünn, pudrig	dicht, uneben, Einsenkungen, zu einer Seite pudrig, sonst samtig
El 111	reinweiß	teilweise breiter grauer Rand mit teerschwärzer Außenlinie, papyrusweiß, safrangelb, cremeweiß	dicht, ungleichmäßig	uneben, Einsenkungen, fusselig, ungleichmäßig
El 112	reinweiß	safrangelb, Rand teilweise cremeweiß	dicht, fusselig, ungleichmäßig	ungleichmäßig, dicht, pudrig, Zonen
El 113	cremeweiß und hellelfenbein	fleckig verkehrsweiß papyrusweiß weiß- u. grau-aluminium, zentral melonengelb, Rand teilweise teerschwärz	dicht, ungleichmäßig	uneben, kompakt, Einsenkungen, fusselig, ungleichmäßig
El 114	reinweiß	weißaluminium, grau, signalweiße Tupfen, Rand teerschwärz	dünn, ungleichmäßig	uneben, kompakt, Einsenkungen, fusselig, ungleichmäßig
El 115	creme- und grauweiß	1/3 grau und zentral mit signalweißen Tupfen, 2/3 pastellgelb, hellelfenbein, reinweiß	kompakt, ungleichmäßig	uneben, kompakt, Einsenkungen, fusselig, ungleichmäßig
El 116	cremeweiß	weißaluminium, grau, signalweiße Tupfen, Rand teilweise teerschwärz	dicht, samtig	uneben, kompakt, Einsenkungen, fusselig, ungleichmäßig
El 117	rein- und cremeweiß	zentraler tiefer Ring weißaluminium mit ockerbraun-pastellgelber Erhebung, Außen ockerbraun, pastellgelb, signalweiß	kompakt, ungleichmäßig	innere Ring eingesenkt, eben, Einkerbungen am Rand, wattig
El 118	reinweiß	1/2 signalweiß, pastellgelb, 1/2 papyrusweiß, signalweiß, Rand teilweise teerschwärz	dicht, fusselig	uneben, kompakt, Einsenkungen, fusselig, ungleichmäßig
El 119	cremeweiß	fleckig verkehrsweiß papyrusweiß weiß- u. grau-aluminium	dicht, samtig	fusselig, ungleichmäßig, scheckig, uneben
El 120	reinweiß und rapsgelb	flatschig pastellgelb u. reinweiß	strahlenförmig, dicht und dünn, pudrig	samtig, eben, ungleichmäßig, dicht
El 121	verkehrsweiß	papyrusweiß auf verkehrsschwarzen Untergrund, Rand verkehrsschwarz, reinweißer safrangelber Sektor, Rand teilweise teerschwärz	dicht und dünn, ungleichmäßig	ungleichmäßig, flach, fusselig
El 122	cremeweiß mit rapsgelben Ringen	pastellgelb mit melonengelben Flecken, Rand verkehrsweiß	strahlen- und ringförmig, dicht	ungleichmäßig, kompakt, dünner zum Rand, fusselig

Tabelle 9.2: Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit aller Isolate von *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Die Kultivierung erfolgte auf KM-Agar und Biomalz-Agar. Unterteilung der Wachstumsgeschwindigkeit in langsam (ø 0-0,10 cm am Tag, grüne Markierung), mittel (ø 0,11-0,20 cm am Tag, gelbe Markierung) und schnell (ø 0,21-x cm am Tag, rote Markierung).

Wachstumsgeschwindigkeit [ø cm/Tag]											
Stamm	KM	BM	Stamm	KM	BM	Stamm	KM	BM	Stamm	KM	BM
C 398	0,14	0,12	C 444	0,28	0,19	C 490	0,09	0,07	C 535	0,09	0,07
C 399	0,14	0,19	C 445	0,15	0,23	C 491	0,24	0,15	C 536	0,25	0,09
C 400	0,27	0,22	C 447	0,15	0,06	C 492	0,22	0,22	C 537	n.a.	0,09
C 401	0,15	0,12	C 448	0,05	0,07	C 493	0,12	0,08	C 538	0,14	0,06
C 402	0,14	0,13	C 449	0,23	0,23	C 494	0,08	0,05	C 539	0,10	0,07
C 403	0,13	0,15	C 450	0,12	0,17	C 495	0,17	0,21	C 540	0,13	0,12
C 404	0,16	0,14	C 451	0,13	0,08	C 496	0,07	0,05	C 541	0,22	0,12
C 405	0,21	0,20	C 452	0,12	0,18	C 497	0,28	0,21	C 542	0,17	0,09
C 406	0,08	0,04	C 453	0,07	0,02	C 498	0,21	0,19	C 543	0,18	0,09
C 407	0,16	0,09	C 454	0,23	0,23	C 499	0,18	0,10	C 544	0,14	0,08
C 408	0,15	0,16	C 455	0,17	0,21	C 500	0,14	0,08	C 545	0,08	0,08
C 409	0,20	0,17	C 456	0,15	0,20	C 501	0,18	0,15	C 546	0,13	0,10
C 410	0,13	0,13	C 457	0,20	0,18	C 502	0,28	0,33	C 547	0,20	0,07
C 411	0,15	0,11	C 458	0,07	0,06	C 503	0,22	0,21	C 548	0,25	0,11
C 412	0,16	0,21	C 459	0,13	0,09	C 504	0,16	0,10	Es 89a	0,21	0,23
C 413	0,11	0,23	C 460	0,16	0,11	C505	0,12	0,06	Es 60c	0,09	0,17
C 414	0,20	0,13	C 461	0,23	0,11	C 506	0,05	0,04	Es 20d	0,07	0,13
C 415	0,05	0,14	C 462	0,12	0,23	C 507	0,15	0,09	EI 100	0,13	0,07
C 416	0,17	0,16	C 463	0,18	0,18	C 508	0,27	0,09	EI 101	0,19	0,04
C 417	0,18	0,16	C 464	0,14	0,16	C 509	0,24	0,13	EI 102	0,06	0,03
C 418	0,23	0,20	C 465	0,20	0,21	C 510	0,12	0,10	EI 103	0,13	0,03
C 419	0,16	0,17	C 466	0,09	0,05	C 511	0,12	0,07	EI 104	0,06	0,05
C 420	0,11	0,12	C 467	0,11	0,19	C 512	0,27	0,21	EI 105	0,03	0,03
C 421	0,09	0,09	C 468	0,21	0,20	C 513	0,11	0,06	EI 106	0,07	0,06
C 422	0,12	0,10	C 469	0,12	0,14	C 514	0,19	0,08	EI 107	0,08	0,05
C 423	0,07	0,21	C 470	0,17	0,21	C 515	0,06	0,06	EI 108	0,13	0,04
C 424	0,13	0,14	C 471	0,13	0,17	C 516	0,09	0,06	EI 109	0,09	0,05
C 425	0,17	0,14	C 472	0,23	0,21	C 517	0,12	0,07	EI 110	0,11	0,04

Wachstumsgeschwindigkeit [ø cm/Tag]											
Stamm	KM	BM	Stamm	KM	BM	Stamm	KM	BM	Stamm	KM	BM
C 426	0,16	0,15	C 473	0,13	0,08	C 518	0,12	0,10	EI 111	0,03	0,04
C 427	0,13	0,06	C 474	0,18	0,19	C 519	0,12	0,03	EI 112	0,09	0,05
C 428	0,13	0,11	C 475	0,25	0,23	C 520	0,09	0,05	EI 113	0,09	0,05
C 429	0,22	0,23	C 476	0,13	0,19	C 521	0,20	0,11	EI 114	0,08	0,04
C 430	0,05	0,11	C 477	0,11	0,11	C 522	0,12	0,07	EI 115	0,05	0,05
C 431	0,12	0,15	C 478	0,12	0,23	C 523	0,18	0,09	EI 116	0,08	0,05
C 432	0,24	0,23	C 479	0,07	0,04	C 524	0,15	0,09	EI 117	0,04	0,05
C 433	0,13	0,18	C 480	0,24	0,20	C 525	0,10	0,09	EI 118	0,09	0,05
C 434	0,10	0,09	C 481	0,15	0,14	C 526	0,10	0,08	EI 119	0,06	0,04
C 435	0,11	0,13	C 482	0,10	0,07	C 527	0,24	0,12	EI 120	0,16	0,07
C 436	0,23	0,20	C 483	0,11	0,11	C 528	0,08	0,03	EI 121	0,10	0,04
C 437	0,25	0,21	C 484	0,17	0,25	C 529	0,13	0,09	EI 122	0,11	0,06
C 438	0,13	0,16	C 485	0,10	0,07	C 530	0,08	0,06			
C 439	0,22	0,15	C 486	0,07	0,07	C 531	0,13	0,13			
C 441	0,19	0,18	C 487	0,22	0,12	C 532	0,07	0,07			
C 442	0,10	0,10	C 488	0,16	0,07	C 533	0,07	0,06			
C 443	0,21	0,25	C 489	0,08	0,10	C 534	0,18	0,10			

Tabelle 9.3: Qualitative Exoenzymbestimmung der *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Stämme C398 bis EL120. Tests von 2-3 Wochen alten Stämmen auf Spezialnährmedien, Wachstum bei 20°C und 12 h Licht. - negativ, (+) schwach positiv, + positiv, ++ stark positiv, k kontaminiert. Gleiche farbliche Unterlegung der Stämme bedeutet identische Herkunft (Tab. 3.1). Weitere Erläuterungen zu Abkürzungen siehe Tabellenende.

Enzymtest	Cellulase	β-Glucosidase	Laccase	Peroxidase	Polyphenol-oxidase	Tyrosinase		Amylase	Lipase
Medium	Cellulose-Röhrchen	Esculin-Agar	LME-Agar + Syringaldazin	LME-Agar + Syringaldazin + H ₂ O ₂	Tanninagar	p-Cresol-Agar		Stärke-Agar + Jodjodkalium	Tween-20-Agar
						Medium-farbe (hellgelb)	Reaktion		
positiver Stamm	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Xylaria hypoxylon</i>	<i>Phialocephala fortinii</i>				
<i>H. p.</i> Stamm									
C 398	- M	+	(+)	+	(+) s	d	(+) Mb	-	+
C 399	(+) 0,5,M	+	++	- p	-	d	+ Mb	-	-
C 400	- M,g	+	-	-	(+)	d	+ Mb	-	++
C 401	- M,g	+	-	-	-	d	+ Mb	(+)	(+)
C 402	(+) 1,5,M	+	+	-	- M	u	(+) Mb	(+)	+
C 403	- M	+	+	- p	+ M	d	+ Mb	(+)	++

Enzymtest	Cellulase	β -Glucosidase	Laccase	Peroxidase	Polyphenol-oxidase	Tyrosinase		Amylase	Lipase
<i>H. p.</i> Stamm									
C 404	- M	+	+	-	-	d	++ Mb	-	++ M
C 405	- M	+	++	-	+ M	d	++ Mf	-	+
C 406	- M	(+)	+	- p	-	u	(+) Mb+ge	+	
C 407	- M	(+)	-	+	-	d	++ Mb	-	
C 408	- M,g	+	-	-	-	dd	++ Mb	+	++
C 409	- (k)	-	-	-		u	(+) Mw	-	++ M
C 410	- M;	+	++	- p	-	d	(+) Mb	+	+
C 411	- M,g	+	(+)	-	-	d	+ Mb	+	+
C 412	(+) 2,M	(+)	+	-	-	u	(+) Mb	-	-
C 413	- M,(g)	(+)	++	- p	-	u	(+) Mb	+	+
C 414	- M,g	+	-	-	+ S	d	+ Mb	-	+
C 415	- M,(g)	+	+	- p	(+)	d	+ Mb	-	+
C 416	(+) 1,M	-	-	-	+	dd	++ Mb		+ M
C 417	(+) 2,M	+	++	-	(+)	d	+ Mb	-	+ S
C 418	- M	+	+	-	(+)	dd	+ Mb	+	(+)
C 419	- M	+	++	- p	(+) s	u	(+) Mw	-	+
C 420	(+) 1,5,M	+	++	- p	+ M	d	+ Mb	-	(+)
C 421	(+) 0,5M	+	++	- p	-	d	+ Mb	(+)	+
C 422	- M	(+)	-	-	(+) s	d	++ Mf+b	-	++ M
C 423	- M,g	+	(+)	+	+ S	d	+ Mb	(+)	+
C 424	- M,(g)	+	++	- p	-	d	+ Mb	-	(+)
C 425	- M	+	(+)	-	-	d	+ Mb	(+)	+
C 426	- M	+	+	-	+ M	d	+ Mb	-	+
C 427	- M	(+)	++	- pp	-	u	(+) Mw+ge	(+)	+ S
C 428	- M	+	++	-	-	u	(+) Mw	+	++
C 429	(+) 1,5,M	+	++	- p	(+)	u	+ Mf	++	+
C 430		+	+	- p	- M	u	++ Mb	(+)	(+) M knall- gelbes Me- dium
C 431	- M	+	+	-	-	d	+ Mb	-	++
C 432	- M	+	(+)	+	(+) s	dd	++ Mb	+	++
C 433	+ 2,M	+	+	- p	(+) s	u	(+) Mw	-	++
C 434	- M,g	+	++	-	-	d	++ Mb	+	++
C 435	+ 1,5,M	+	++	- p	-	d	(+) Mb	(+)	+
C 436	- M,g	+	++	-	(+)	u	(+) Mf	-	+
C 437	- M,g	+	-	-	(+)	dd	++ Mf	(+)	+
C 438	- M,g	+	++	- p	(+) s	u	(+) Mw	-	-
C 439	- M	(+)	-	+	-	n.a.	(+)	-	-
C 441	- M,g	+	++	-	(+)	d	+ Mw	-	+

Enzymtest	Cellulase	β -Glucosidase	Laccase	Peroxidase	Polyphenol-oxidase	Tyrosinase		Amylase	Lipase
<i>H. p.</i> Stamm									
C 442	(+) 1,5,M,g	+	++	- p	(+) s	d	+ Mb	-	+
C 443	- M,g	+	+	- p	(+)	d	+ Mb	-	++
C 444	(+) 1,M,g	+	-	-	(+)	d	+ Mb	-	(+)
C 445	- M,g	+	++	-	+ M	u	(+) Mw	-	+ s
C 446	- M	(+)	+	- (p)	-	u	+ Mge+b	+	
C 447	- M,g	+	++	-	-	u	(+) Mb	+	++
C 448	- M,g	+	++	- p	-	d	+ Mb	(+)	+
C 449	- M,g	+	-	+	+ M	d	+ Mb	-	+
C 450	- M,g	+	+	- p	-	d	+ Mb	-	+
C 451	- M	(+)	(+)	- (p)	-	u	++ Mge+w	(+)	(+) s
C 452	- M,g	+	++	-		u	(+) Mw	-	+
C 453	- M	-	(+)	++	-	d	+ Mw+b	++	+ s
C 454	- M,g	+	(+)	+	(+)	u	++ Mw	-	+
C 455	- M,(g)	++	++	-	(+)	u	(+) Mw	-	(+)
C 456	- M	++	-	-	-	u	(+) Mw	-	+
C 457	(+) 1,M	++	-	-	-	d	+ Mb	-	+
C 458						u	(+) Mb+w	-	-
C 459	- M	-	(+)	-	-	u	+ Mge+w	(+)	+ M rot
C 460	- M,g	++	++	-	-	d	+ Mb	(+)	+ s
C 461	(+) 1,M,g	++	(+)	-	(+)	u	+ Mw	+	++
C 462	- M	++	+	- p	(+)	d	+ Mb	-	+
C 463	- M,g	++	+	-	-	d	+ Mb	(+)	+ s
C 464	- M,g	++	-	(+)	(+)	dd	++ Mb	-	(+)
C 465	(+) 1,5,M	++	-	-	(+)	d	+ Mf+b	+	+ s
C 466	- M	(+)	++	- pp	-	u	(+) Mw	-	(+) s
C 467	(+) 2,M	++	+	- p	(+)		(+)	(+)	+ s
C 468	- M,g	++	++	- p	(+)	dd	++ Mb+w	+	(+)
C 469	- M,(g)	++	(+)	+	-	dd	+ Mb	-	+
C 470	- M,(g)	++	(+)	+	(+)	d	+ Mb	-	++
C 471	- M(g)	++	(+)punktue II	- p	(+)	d	+ Mg	-	(+)
C 472	- M	++	+	- p	(+)	u	(+) Mf+w	(+)	+
C 473	- M		-	-	+	u	(+) Mge+w	-	
C 474	(+) 2,M	++	(+)	+	-	d	+ Mf+w	(+)	+
C 475	- M,g	++	+	-	-	d	+ Mf+w	-	+
C 476	- M,g	++	++	-	-	d	(+) Mb	++	++
C 477	- M	-	++	- pp	-	u	++ Mb	(+)	(+)
C 478	- M,g	++	++	-	-	d	++ Mb	-	++
C 479	- M	(+)	-	(+)	-	d	+ Mb	-	+ s

Enzymtest	Cellulase	β -Glucosidase	Laccase	Peroxidase	Polyphenol-oxidase	Tyrosinase		Amylase	Lipase
<i>H. p.</i> Stamm									
C 480	+ 2,M	-	-	+	-	u	++ Mw	-	++ M
C 481	+ 1,5,M	(+)	(+)	-	(+)	dd	++ Mb	(+)	+
C 482	- M	(+)	-	(+)	-	d	+ Mb+ge	-	(+) s
C 483	(+) 0,5,M	(+)	++	- pp	-	d	++ Mb+ge	-	(+) s
C 484	(+) 0,5,M	+	++	-	(+)	u	(+) Mw	+	-
C 485	+ 0,5,M	(+)	++	- pp	-	u	(+) Mb+w	-	(+) s
C 486	- M	-	-	-	-	u	++ Mb+ge	(+)	(+) s
C 487	+ 2,M	(+)	-	(+)	(+)	d	(+) Mf	-	++
C 488	- M	-	(+)	+	-	u	++ Mge+w	++	++ M braun
C 489	- M	-	(+)	++	(+)	d	+ Mb	-	++
C 490	- M	(+)	(+)	- p	-	dd	+ Mb+w	-	+ s
C 491	- M	+	(+)	-	-	u	+ Mge+w	-	+ s
C 492	- M,g	(+)	+	-	(+)	u	(+) Mf+w	(+)	++ s
C 493	- M,g	-	++	- pp	-	d	+ Mb	-	++ s
C 494	- s	-	(+)	+	- s	u	- Mge+b+ w	+	+ M weiß
C 495	- M,g	(+)	++	-	(+)	u	(+) Mb+w	-	++ s
C 496	- M,g	(+)	-	-	-	d	+ Mb	+	+ s
C 497	- Mycel unter Cellulose- schicht ins Medium gewachsen, g	+	-	(+)	(+)	d	(+) Mf+b	(+)	++ M
C 498	- M	+	(+)	-	(+)	d	+ Mf+b	-	+ M
C 499	- M	+	-	-	-	u	+ Mw	-	++ M roséwe iß
C 500	- M	(+)	-	-	-	d	+ Mf+b	-	++ M rot- braun
C 501	- M	-	++	-	(+)	u	- Mw+rosa	-	++ M
C 502	- M,g	(+) M	+	- p	-	u	(+) Mf	++	++ M
C 503	- M,g	(+)	(+)	-	(+)	u	(+) Mw	-	++ M
C 504	- M,g	(+)	++	- p	- s	u	(+) Mw	-	++ M rot
C 505	- s	(+)	(+)	-	-	u	+ Mw+ge	-	(+)
C 506	- M	-	-	-	-	u	++ Mb	-	+ s
C 507	- M	-	(+)	+	- s	u	+ Mge+w	+	(+)
C 508	- M	(+)	-	-	-	u	++ Mw	(+)	+ s
C 509	+ 1,5,M	-	+	-	-	d	+ Mb	-	++
C 510	+ 2,M,g	(+)	++	- p	(+)	d	+ Mb	+	+ s
C 511	- M	++	(+)	- (p)	-	d	++ Mw+b	+	++ s

Enzymtest	Cellulase	β -Glucosidase	Laccase	Peroxidase	Polyphenol-oxidase	Tyrosinase		Amylase	Lipase
<i>H. p.</i> Stamm									
C 512	n.a., g	+	-	-	-	dd	+ Mf	+	++
C 513	- s,g	(+)	++	- p	- s	u	- Mge+w	+	+ s
C 514	- M,g	++	+	- p	- s	u	(+) Mw	-	+ M weiß
C 515	- M,g	+	(+)	+	(+) s	u	+ Mw+b	-	
C 516	- M,g	(+)	-	-	- s	u	+ Mge+b+w	(+)	+ M
C 517	- M,g	(+)	+	- (p)	-	u	++ Mw+b	(+)	+ s
C 518	- M,g	+	(+)	+	- s	u	+ Mge+b	(+)	+ M
C 519	- M,g	+	(+)	+	-	u	+ Mw+b	+	(+) s
C 520	- Mycel unter Cellulose- schicht ins Medium gewachsen	(+)	+	- p	- s	d	++ Mb	+	(+) s
C 521	- M	+	-	-	- s	u	+ Mw+ge	(+)	(+) s
C 522	- M,g	+	+	- p	- s	u	- Mw	+	(+) s
C 523		+						?	(+) M
C 524	- M	(+)	(+)	++	-	u	+ Mw+ge	+	
C 525	- M,g	-	-	(+)	- s	u	+ Mb	+	(+) s
C 526	- M,g	(+)	-	-	(+) s	u	+ Mge+b	+	(+) s
C 527		+			- s				- s
C 528	- M,g	+	+	- p	- s	u	+ Mge+b	++	(+) s
C 529	+ 1,5,M	(+)	(+)	+	- s	d	+ Mge+b	+	
C 530		(+)	(+)	+		u	(+) Mb	+	
C 531		(+)	(+)	+		d	+ Mb+g	-	++ M rot
C 532	- M,g	(+)	+	++	(+) s	u	+ Mb	+	++ M rot
C 533	- M	+	-	-	- s	d	++ Mb	(+)	+ s
C 534	- M,g	(+)	-	+	-	u	(+) Mb	-	+ s
C 535	- M,g	+	(+)	- (p)	(+) s	u	+ Mw+b	(+)	+ s
C 536		++	+	- (p)		u	(+) Mb	(+)	
C 537	- M		-	-	-	u	++ Mw+b	+	(+) s
C 538	- M	(+)	++	- p	-	u	+ Mw+b	(+)	+ s
C 539		+	+	- p		u	(+) Mw+b	(+)	
C 540		++	(+)	+	- s	u	(+) Mw+b	(+)	- s
C 541	- M,g	(+)	-	+	- s	u	(+) Mb	(+)	(+) s
C 542	- M	+	++	- p	-	u	(+) Mb	+	++ M
C 543	+ 1,5,M	+	-	+	(+)	u	++ Mw+b	++	(+) s
C 544	- M	+			(+)	u	+ Mw+ge	(+)	++ M rot
C 545	- M	+	+	++	(+)	u	+ Mw+b	-	+ s

Enzymtest	Cellulase	β -Glucosidase	Laccase	Peroxidase	Polyphenol-oxidase	Tyrosinase		Amylase	Lipase
<i>H. p.</i> Stamm									
C 546	n.a.	(+)	(+)	-	(+)	u	+ Mw+b	(+)	(+) s
C 547	(+)0,5,M	+	++	- p	-	u	(+) Mw+b	-	+ M
C 548	- M	(+)	+	- p	-	u	(+) Mw	(+)	++ s
Es 89a	- M	+	-	+		u	(+) Mw	(+)	+
Es 60c	- M,g	+	+	-	(+)	d	(+) Mb	-	+
Es 20d	- M,g	+	++	-	-	dd	++ Mb	-	++
EL 100	- M	-	(+)	- (p)	-	d	+ Mb	-	+ s
EL 101	- M	+	(+)	-	-	u	++ Mge	(+)	+ s
EL 102	- M	(+)	-	-	-	u	++ Mw+g+g e	(+)	+ s
EL 103	- M	+	-	-	(+)	d	(+) Mr+b	(+)	+ s
EL 104	- M	+	-	-	-	u	++ Mb	+	++ M
EL 105	- M	+	+	-	-	u	+ Mw+b	(+)	+ s
EL 106	- M	+	(+)	+	(+)	u	++ Mw+b	(+)	+ s
EL 107	- M	+	(+)	- (p)	-	u	+ Mge+b	-	+ s
EL 108	- M	+	-	(+)	-	u	++ Mb+w	+	+ s
EL 109	- M	(+)	(+)	+	-			(+)	+ s
EL 110	- M	(+)	-	-	-	u	+ Mb+w	(+)	+ s
EL 111	- M	(+)	+	- p	-	u	++ Mb+w	-	+ s
EL 112	- M	(+)	+	- p	-	u	+ Mw+b	-	+ s
EL 113	- M	+	-	-	-	u	(+) Mg+w+s	(+)	+ s
EL 114	- M	+	-	-	-	u	++ Mge+s	(+)	+ s
EL 115	- M	+	+	- p	-	u	++ Mb+ge	(+)	+ s
EL 116	- M	+	(+)	-	-	u	+ Mb+w	(+)	+ s
EL 117	- M	(+)	++	- pp	-	d	++ Mw+ge+ b	+	+ s
EL 118	-M	(+)	(+)	+	-	d	+ Mb	(+)	+ s
EL 119	- M	+	-	-	-	u	++ Mw+g	(+)	+ s
EL 120	- M	+	+	- p	-	d	+ Mb	(+)	+ s
EL 121	- M	+	(+)	- (p)	-	u	++ Mw+g	(+)	+ s
EL 122	- M	+	++	- p	-	u	(+) Mb	-	+ s
Erläuterungen der Abkürzungen zur jeweiligen Spalte:									
						d dunkel	(+) hellgelb		
	g gelbes Medium (sonst blass gelblich)					dd sehr dunkel	+ gelb-braun		
	M Mycel		p pink	p pink	s sporuliert	u unverändert	++ braun-rot		s sporuliert

	Zahl = cm die der Farbstoff nach unten gewandert ist				M Myzel		Mb Myzel braun		M Myzel
	n.a. nicht ange- wachsen						Mw Myzel weiß		
	s sporuliert						Mf Myzel farblos		
							Mg Myzel grau		
							Mge Myzel gelb		
							Mr Myzel rot		
							Ms Myzel schwarz		